

**DIE SPALTUNG NATÜRLICHER UND SYNTHETISCHER
KOLLAGENASESUBSTRATE DURCH ENZYME
DER MÄUSEHAUT**

Wolfgang Brandmair

1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548326_0032

Aus dem Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung
München
Abteilung Prof.Dr.K.Hannig

DIE SPALTUNG NATÜRLICHER UND SYNTHETISCHER KOLLAGENASE-
SUBSTRATE DURCH ENZYME DER MÄUSEHAUT

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Wolfgang Brandmair
aus
Freising/Oberbayern
1973



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof.Dr.K.Hannig

Mitberichterstatter: Prof.Dr.Th.Bücher

Dekan: Prof.Dr.W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 24. 4. 1973

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von
Herrn Prof.Dr.K.Hannig in der Zeit vom März 1970
bis Juli 1971 an dem Max-Planck-Institut für Ei-
weiß-und Lederforschung in München durchgeführt.

Herrn Prof.Dr.K.Hannig danke ich für sein
Wohlwollen und die großzügige Förderung
dieser Arbeit

Herrn Dr.L.Strauch danke ich für wertvolle
Ratschläge in technischen Fragen.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. EINLEITUNG	1
1. <u>Vorkommen, Bau und Bedeutung des Bindegewebes</u>	1
1.1. Die Interzellulärsubstanz	1
1.1.1. Bindegewebsspez. Proteine	1
1.1.2. Mukopolysaccharide	2
1.1.3. Substanzen exogener Herkunft	2
1.2. Die Zellen	
1.2.1. Die fixen Zellen	2
1.2.2. Die freien Zellen	3
1.3. Fibrilläre Bestandteile des Bindegewebes	3
1.3.1. Retikulin	4
1.3.2. Elastin	4
1.3.3. Kollagen	4
2. <u>Herstellung der Kollagenfibrille</u>	6
2.1. Die Biosynthese	6
2.2. Mechanismus der Fibrillenbildung	8
3. <u>Enzymatischer Abbau von Kollagen</u>	9
3.1. Unspezifische Proteinasen	9
3.2. Echte Kollagenasen	9
3.2.1. Definition	10
3.2.2. Historisches	10
3.2.3. Clostridiopeptidase A	11
3.2.4. Enzymtypen von Cl. histolyticum	12
3.2.5. Kollagenasen außerhalb des Bakterien- reiches	13
3.2.5.1. tadpole-Kollagenase	14
3.2.5.2. Säugetierkollagenasen	15
3.2.6. Mit künstlichem Substrat getestete kollagenolytische Enzyme	18
4. <u>Aufgabenstellung</u>	19
II. ERGEBNISSE	20
1. <u>Quantitativer Nachweis von Enzymaktivitäten im Verlauf der Kultivierung</u>	
1.1. Die Gewebekultur	20
1.1.1. Versuchsansatz	20

	Seite
1.1.2. Das Nährmedium	20
1.2. Die Vitalität der Zellen	22
1.2.1. Die lysosomalen Enzyme	22
1.2.2. Elektronenmikroskopie	23
1.2.3. Züchtungsversuch	24
1.3. Sterilitätskontrolle	25
1.4. Proteinbestimmung im abgekippten Medium	26
1.5. Kollagenasebestimmung mit nativem Kollagen- substrat	28
1.5.1. Die Hydroxyprolinbestimmung	28
1.5.2. Die radioaktive Kollagenasebestimmung	29
1.6. Die Viskosimetrie	33
1.7. Analytische Diskelektrophorese	38
1.8. Kombiniertes Trenn- und Nachweisverfahren	39
1.9. Testung auf unspezifische Proteolyse	40
1.10. Testung mit dem künstlichem Substrat	42
2. <u>Anreicherung des kollagenolytischen Enzyms</u>	43
2.1. Gelfiltration mit Bio-Gel	43
2.2. Kurze Charakterisierung	45
3. <u>Isolierung des Peptid spaltenden Enzyms</u>	46
3.1. Vorbereitung des Rohmaterials	46
3.2. Trägerfreie Elektrophorese	47
3.3. Gelfiltration mit Bio-Gel	49
3.4. Reinheitskontr. mit analyt. Diskelpho.	50
4. <u>Charakterisierung der Peptidase</u>	51
4.1. Dünnschichtchromatographie	52
4.2. Molekulargewichtsbestimmung	52
4.3. pH-Optimum	53
4.4. Michaelis-Menton-Konstante	54
4.5. Abhängigkeit von Calciumionen	57
4.6. Einwirkung von Serumproteinen	57
4.7. Angriff auf natives Kollagen	58
III. Diskussion	60
IV. Methodik	67
V. Zusammenfassung	85a
VI. Literaturverzeichnis	86

I. EINLEITUNG

1. Vorkommen, Bau und Bedeutung des Bindegewebes

Alle höheren Organismen sind aus vier Grundgeweben aufgebaut. Das Epithelgewebe bedeckt innere Oberflächen und bildet die äußere Schutzschicht der Haut. Das Nervengewebe verbindet das Individuum mit seiner Umwelt. Das Muskelgewebe erfüllt die Aufgaben der willkürlichen und unwillkürlichen Bewegung. Das Bindegewebe und Stützgewebe verbindet oder umhüllt einzelne Organe und durchzieht mehr oder weniger kontinuierlich den ganzen Organismus.

Dazu gehören das Corium der Haut, die inneren Membranen Peritoneum, Pleura und Perikard, die organische Grundsubstanz der Knochen und Zähne, Teile des Bewegungsapparates wie Bänder, Sehnen, Knorpel und Synovialgewebe, schließlich das Stroma von Gefäßen, Lymphdrüsen und aller sonstigen Organe.

Obwohl alle hierzu gehörenden mechanischen und statischen Aufgaben durch eine sehr unterschiedliche morphologische Struktur bewältigt werden, läßt sich doch ein typischer Aufbau des Bindegewebes in zelluläre und extrazelluläre Elemente erkennen.

Mengenmäßig überwiegen bei weitem die extrazellulären Elemente. Darunter faßt man die Bindegewebsfasern Kollagen, Retikulin und Elastin zusammen im Gegensatz zu der strukturlosen Grundsubstanz, die nur die Matrix für die strukturierten Bestandteile bildet. Beide Komponenten können in sehr unterschiedlichem Verhältnis zusammentreten; während z. Bsp. in Sehnen und Bändern die Fasern stark überwiegen, setzt sich der Glaskörper des Auges fast vollständig aus nicht strukturierter Grundsubstanz zusammen, die von einem Geflecht zarter Kollagenfasern durchzogen wird.

1.1. Die Interzellulärsbstanz

Die gesamten Bestandteile der Grundsubstanz lassen sich der Herkunft nach in zwei Gruppen unterteilen.

1.1.1. Bindegewebsspezifische Proteine

Ein Teil der Substanzen wird von den ortsständigen Zellen selbst

synthetisiert und bleibt im wesentlichen in der Interzellulärsubstanz lokalisiert. Es handelt sich um die noch wenig erforschten bindegewebsspezifischen Proteine, die auch als nichtkollagene Eiweiße (2) bezeichnet werden, und die sauren Mukopolysaccharide (3).

1.1.2. Die Mukopolysaccharide

Diese besitzen ein gemeinsames Bauprinzip (4); das Molekulargewicht beträgt mehrere Millionen, das Molekül ist wahrscheinlich unverzweigt, durch Uronsäuren und esterartig gebundene Schwefelsäure sind diese Stoffe stark sauer. Bekannte Vertreter dieser Reihe sind die Hyaluronsäure, die Chondroitinschwefelsäure A, B, C und das Heparin.

Zwischen den Mukopolysacchariden und der Kollagensynthese besteht ein Zusammenhang. Im Isotopenversuch (5) konnte gezeigt werden, daß einer gesteigerten Kollagensynthese ein verstärkter Einbau von S-35 in die Mukopolysaccharide vorausgeht.

Infolge der Wasserbindungsfähigkeit der Hyaluronsäure spielen die Mukopolysaccharide auch eine große Rolle als Reservoir der extrazellulären Flüssigkeit, damit im gesamten Wasserhaushalt und in der Regelung der Blutkonzentration. Wenn z. Bsp. bei ungenügender Schilddrüsenfunktion der Gehalt an Hyaluronsäure und Chondroitinsulfat im Bindegewebe steigt, so ergibt sich das Bild des Myxödems.

1.1.3. Substanzen exogener Herkunft

Die zweite Substanzgruppe ist exogener Natur. Da die Zellen des Bindegewebes keinen Kontakt mit dem Blutgefäßsystem besitzen, findet der Austausch von Nährstoffen und Metaboliten in der Grundsubstanz statt. So gelangen durch Diffusion extravasale Serumproteine, Elektrolyte und Nichtelektrolyte (= Bestandteile der Gewebslymphe) dorthin.

1.2.1. Die fixen Zellen

Die ortsansässigen (= fixen) Zellen des Binde- und Stützgewebes

sind die Fibrocyten. Sie sind verzweigt und stehen durch Cytoplasmaausläufer untereinander in Verbindung. Ihr Zelleib ist platt, unauffällig und schwer anfärbbar; dort, wo der Kern liegt, ist er etwas verbreitert. Am besten sind die Fibrocyten im Häutchenpräparat oder in der Gewebekultur zu studieren. Häufig werden Fibrocyt und Fibroblast im gleichen Sinn verwendet. Es soll nämlich die Möglichkeit bestehen, daß der wenig stoffwechselaktive ausgereifte Fibrocyt sich dedifferenziert und zur Fibroblastenform zurückkehrt. In dieser arbeitenden Zelle sind im Phasenkontrastmikroskop zahlreiche Mitochondrien zu sehen, auch ein Golgiapparat und ein Diplosom lassen sich nachweisen. Im Zusammenhang mit der Proteinsynthese finden sich nicht nur große Nukleolen, sondern auch Ergastoplasma und Ribosomen. Einen weitmaschigen Verband wie die Fibrocyten bilden auch die Mesenchymzellen und die Retikulumzellen. Jene kommen im embryonalen Bindegewebe vor, die Retikulumzellen bilden einen Teil der lymphatischen Organe.

1.2.2. Die freien Zellen

Neben den ortsansässigen Zellen gibt es im Bindegewebe auch freie bewegliche Zellen. Das Stützgewebe im engeren Sinn, welches eine Eigenform besitzt, enthält keine freien Zellen. Im lockerem Bindegewebe lagern sich häufig Histiocyten den Gefäßen an, auch die basophil granulierten Mastzellen sind in diesem Gewebe weit verbreitet. Außerdem können in unterschiedlichen Maße Zellen der körpereigenen Abwehr wie Lymphocyten, Monocyten, Plasmazellen und eosinophile Granulocyten angetroffen werden.

Die biologische Funktion der Fibroblasten besteht in der Synthese der geformten und ungeformten Interzellulärsubstanz. Zusätzlich aber sind diese Zellen auch für den Abbau der gebildeten Substanzen verantwortlich. In dieses Spiel von Auf- und Abbauvorgängen greifen viele Faktoren regulierend ein.

1.3. Die fibrillären Bestandteile des Bindegewebes

Kollagen, Retikulin und Elastin bilden die fibrillären Bestand-

teile der Grundsubstanz.

1.3.1. Das Retikulin

Das Retikulin steht dem Kollagen sehr nahe. Es zeigt im Elektronenmikroskop diesselbe Querstreifung wie das Kollagen. Man spricht deshalb auch von präkollagenen Fasern, was ausdrücken soll, daß eine Reifung der Retikulinfasern zu Kollagenfasern möglich ist.

1.3.2. Das Elastin

Völlig verschieden von Kollagen und Retikulin ist das Elastin, dessen Name von seiner über 100 % igen Dehnbarkeit herrührt. (6) Diese Eigenschaft macht es als Bauelement in stark dehnungsbeanspruchten Organen wie z.Bsp. der Aorta (Windkesselfunktion) und der Lunge (elastische Rückstellkräfte) besonders geeignet. Elastin setzt sich zum großen Teil aus apolaren Aminosäuren (Ala, Gly, Pro, Val) zusammen, bemerkenswert ist das Fehlen von Hydroxyprolin und Hydroxylysin. Es besitzt eine sehr schlecht definierte Anordnung und ist quantitativ sehr schwer zu bestimmen. Eine geordnete Struktur erscheint sehr fraglich, da es weder typische Röntgeninterferenzen noch eine charakteristische Querstreifung im Elektronenmikroskop gibt. Auf Grund der Quervernetzung besitzt Elastin eine hohe Resistenz enzymatischen Angriff. Im nativen Zustand wird es nur von einer spezifischen Elastase abgebaut, selbst nach Hitzedenaturierung bleibt Elastin gegenüber anderen Proteasen resistent. (7)

1.3.3. Das Kollagen

Das wichtigste Skleroprotein ist das Kollagen. Etwa ein Drittel der Gesamtproteine entfallen auf dieses Protein. Neben seiner eminenten biologischen Bedeutung bei Makroorganismen sollte die technisch-wirtschaftliche Bedeutung nicht vergessen werden. In der Haut findet man kollagene Fasern in dreidimensionaler Anordnung, als parallele, dicht gepackte Bündel bilden sie die Sehnen. Sie besitzen einen sehr hohen Elastizitätsmodul. Die kleinsten Ein-

heiten (=Kollagenmonomeren) lagern sich zu reifen Fasern zusammen, wobei intermolekulare Bindungen die enorme Stabilität bewirken.

Die Aminosäureanalyse des Kollagens ergibt folgende prozentuale Verteilung: apolare Aminosäuren 66 % (Glycin 33 %, Alanin 11 %, Prolin 13 %, Hydroxyprolin 9 %), polare Aminosäuren Arginin (5 %), Glutaminsäure (7,5 %) und Asparaginsäure (5 %) machen zusammen 18 % aus. Aromatische Aminosäuren ergeben sich zu 1 %.

Hydroxyprolin und Hydroxylysin kommen ausschließlich im Kollagen vor. Deshalb kann die Hydroxyprolinbestimmung (8,9) sowohl qualitative wie quantitative Aussagen über Kollagen machen.

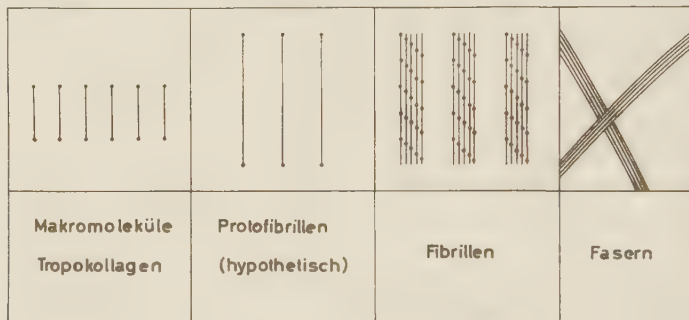
In der Peptidkette (10,11) wechseln Regionen apolarer Aminosäuren mit solchen polarer Aminosäuren ab. Diese wiederum besitzen Bereiche mit mehr basischen oder mehr sauren Aminosäuren. Der Wechsel von apolaren und polaren Bereichen spielt eine wichtige Rolle für die Fibrillenbildung. Für die apolaren Bereiche wurde die Sequenz Gly-Pro-X nachgewiesen (Position x wird häufig von Hypro und Ala eingenommen); sie dürfte zu einem Drittel am Aufbau der Kette beteiligt sein und das wichtigste Strukturelement darstellen.

Im Unterschied zu der bei Proteinen häufigeren α -Helix formiert sich jede der drei Polypeptidketten zu einer linksgewundenen Helix. Man weiß heute mit Sicherheit, daß die beiden Aminosäuren Prolin und Hydroxyprolin für diese Besonderheit verantwortlich sind. Diese drei Linksschrauben verdrillen sich miteinander zu einer rechtsdrehenden Superhelix, die durch Wasserstoffbrücken der Iminogruppen einer Kette mit Carbonylgruppen der anderen Kette stabilisiert wird.

Das Wissen um die Quartärstruktur wurde durch die Anwendung der Elektronenmikroskopie wesentlich erweitert. Die von Baer (12) 1952 aufgestellte Theorie, nach der die dunklen Querstreifen eine Anhäufung polarer Aminosäuren darstellen und die hellen sich vorwiegend aus apolaren Aminosäuren zusammensetzen, hat sich durch viele experimentelle Ergebnisse bestätigen lassen. K. Kühn (13) war es möglich, die dunklen Querstreifen noch weiter in Bereiche mit mehr basischen einerseits und mehr sauren Aminosäuren andererseits zu differenzieren.

Das elektronenmikroskopische Bild zeigt eine assymmetrische Querstreifung der Fibrille von 650 Å. Diese kommt dadurch zustande, daß sich die Kollagenmoleküle um ein Viertel in ihrer Länge versetzt aneinander lagern (14).

Abschließend seien die wichtigsten Daten des Kollagens zusammengefaßt: Das Kollagenmolekül hat die Form eines Stäbchens, dessen Achsen sich wie 200 : 1 verhalten. Es ist 2800 Å lang und hat einen Durchmesser von 14,5 Å (15); sein Molekulargewicht beträgt 300.000, jede der drei Peptidketten besteht aus 1000 Aminosäuren, die durch intermolekulare Bindungen zusammengehalten werden.



2. Die Herstellung der Kollagenfibrille

Obwohl das Kollagenmolekül in Bau und Zusammensetzung eine Sonderstellung (16) einnimmt, wird es doch im elementaren Apparat der Proteinsynthese hergestellt.

2.1. Die Biosynthese

Im ersten Schritt werden die Aminosäuren unter Mitwirkung von ATP und einer für jede Aminosäure spezifischen Synthetase in einen energiereichen Zustand überführt. Eine Besonderheit stellt die Tatsache dar, daß gerade für die kollagentypischen Aminosäuren Hydroxyprolin und Hydroxylysin keine aktivierenden Enzyme vorhanden sind

(17). Wird also radioaktives Hypro oder Hyllys zur Synthese angeboten, so findet sich keine Markierung im Kollagen (18,19). Das Problem, auf welcher Stufe die enzymatische Hydroxylierung stattfindet (20), wurde von vielen Forschern bearbeitet.

Als erste konnten Gould et al. (21) nach Anwendung von markierten Prolin einen Hypro-RNS-Komplex isolieren, später gelang es ihnen auch den Hyllys-RNS-Komplex zu isolieren (22). Diese Befunde wurden von mehreren Gruppen bestätigt. (23,24) Die Frage, ob bereits der Prolyl-Adenylat-Komplex oder erst der als nächstes gebildete Prolyl-RNS-Komplex hydroxyliert wird, entschied Coronado (25) zugunsten der letzteren Möglichkeit. Daneben wurde auch die Anschauung vertreten, daß der Übergang Pro zu Hypro erst am höhermolekularen, ribosomal gebundenem Substrat stattfindet. Diese von Udenfriend (26) und Prockop (27) vertretene Hypothese wurde jüngst von Bachra und Erb (28) bestritten. Sie boten in der Gewebekultur von Mäusefibroblasten tritiertes Prolin zur Synthese an. Ihre mit dieser Versuchsanordnung erzielten Ergebnisse sprechen sehr dafür, daß erst die vollständig gebildete Kollagenkette hydroxyliert wird. Diese wird dann sogleich in den extrazellulären Raum ausgestoßen. Die früheren Ergebnisse konnten sie auf methodische Unzulänglichkeiten zurückführen.

Im zweiten Schritt wird die aktivierte Aminosäure auf die Transfer-RNS übertragen, die ebenfalls für jede Aminosäure streng spezifisch ist. Die Verknüpfung der Einzelbausteine zum Polypeptid läuft an der m-RNS ab, die an Ribosomen angelagert ist. Zur Polymerisation werden außerdem ein Enzym und als Energiequelle GTP benötigt. Auch dieser Schritt wirft viele interessante Detailfragen auf, die trotz intensiver Bemühungen erst teilweise beantwortet werden konnten.

Für die Synthese der α -Ketten (etwa 1000 Aminosäuren) wurde von Snellman (29) zunächst ein zweistufiger Mechanismus angenommen. Demnach sollten zwei Untereinheiten extrazellulär zu größeren Molekülen verknüpft werden. Diese Hypothese wurde durch Arbeiten von Kretsinger et al. (30), Malt und Speakman (31), Vuust und Piez (32) widerlegt. Sie fanden in guter Übereinstimmung, daß etwa 100 Einzelbausteine das kollagensynthetisierende Polysom bilden. In allerjüngster Zeit wurden diese Ergebnisse korrigiert (33), die

Kollagenpolysomen sollen nur aus etwa 30 Ribosomen bestehen.

2.2. Der Mechanismus der Fibrillenbildung

Die Tripelhelix setzt sich normalerweise aus zwei α_1 - und einer α_2 -Kette zusammen. (Auch drei verschiedene α -Ketten wurden gefunden (34)). Diese unterscheiden sich geringfügig in ihrer Aminosäurezusammensetzung.

Die Denaturierungsprodukte von Kollagenlösungen besitzen verschiedene Molekulargewichte (35). Es entstehen neben der α -Kette mit dem Molekulargewicht 100000 auch eine Komponente mit 200000 (β -Komponente) und mit 300000 (γ -Komponente). Die β -Komponente wird durch eine intramolekulare Bindung gebildet. Demnach ergibt sich durch Kombination von zwei α_1 -Ketten β_{11} , eine α_1 -Kette und eine α_2 -Kette verbinden sich zu β_{12} . Die γ -Komponente wird durch zwei intramolekulare Bindungen gebildet. Da beim Proteasenangriff auf nichthelikale Endbezirke der Tripelhelix die intramolekularen Erücken verloren gehen, wird die Quervernetzung dort lokalisiert (36).

Die im extrazellulären Raum befindlichen Tropokollagenmoleküle müssen zur Erfüllung ihrer physiologischen Funktion zur unlöslichen Fibrille ausreifen. Obwohl eine Fülle von Arbeiten über Fibrillenbildung in vitro vorliegt, ist der Hergang in vivo noch weitgehend unbekannt.

K. Kühn (37) zeigte, daß die säurelösliche Kollagenfraktion nicht als Zwischenprodukt (38) der Ausreifung, sondern als Nebenprodukt aufzufassen ist.

Einen wesentlichen Einfluß auf die Aggregation der Moleküle übt deren Ladungsmuster aus. Die Anordnung der polaren Aminosäuren längs der Kette soll für die Viertelversetzung verantwortlich sein (39).

Daneben spielen die Begleitsubstanzen (40) eine große Rolle. Zum einen fand man, daß von ihnen die Geschwindigkeit der Fibrillenbildung abhängt, zum anderen können sie auch das Querstreifungsmuster verändern. Beides dürfte wohl auf einer Wechselwirkung mit sauren Mukopolysacchariden beruhen.

Die locker aggregierten Fibrillen (unter physiologischen Bedingun-

gen extrahierbar) werden durch drei intermolekulare Bindungen verfestigt (41): Die hintereinander gelagerten, sich überlappenden Moleküle bilden "head-to-tail"-Bindungen und "end to end"-Bindungen aus. Die seitliche Verfestigung wird durch sogenannte "side to side"-Bindungen erreicht.

Während das Wissen um Biosynthese und Struktur des Kollagens schon sehr weit fortgeschritten ist, war die Erforschung des Kollagenabbaues lange Zeit von Mißerfolgen begleitet.

3. Der enzymatische Abbau von Kollagen

Proteinasen katalysieren die Spaltung der Peptidbindung $-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-NH-$, wobei das Gleichgewicht weit auf Seiten der Reaktionsprodukte liegt. Diese Bindung kann am Ende oder in der Mitte der Peptidkette liegen. Die Enzyme dieser Gruppe besitzen ein sehr unterschiedliches pH-Optimum und spalten bestimmte Peptidbindungen bevorzugt.

3.1. Unspezifische Proteinase

Infolge seiner komplizierten Bauweise ist das Kollagen gegen Angriffe unspezifischer, proteolytischer Enzyme weitgehend geschützt. Trypsin, Chymotrypsin, Papain, Elastase und Pronase besitzen bei hohem Enzym-Substratverhältnis eine minimale Aktivität, solange das Molekül seine native Struktur aufweist. Gemeinsame Merkmale dieser Enzymgruppe sind der Angriff auf die nichthelikalen Endbezirke des Kollagens (=Telo peptide) und die begrenzte Reaktionsdauer von ein bis zwei Stunden. Des weiteren werden sie von EDTA (Komplexbildner für zweiwertige Ionen) in ihrer Aktivität nicht beeinflusst. Diese Befunde spielen für den Kollagenabbau in vivo keine Rolle.

3.2. Echte Kollagenasen

Den unspezifischen Proteinase steht eine Gruppe von substratspezifischen Enzymen gegenüber. Sie werden als Kollagenasen be-

zeichnet.

3.2.1. Definition

Einer strengen Definition nach werden zu dieser Gruppe nur Enzyme gerechnet, die natives Kollagen in fester oder gelöster Form bei physiologischen Bedingungen ($\text{pH}=7,2$; Temperatur 37°) in spezifischer Weise schnell spalten können. Ergänzt wurde diese Definition von Jahn und Nordwig (42). Sie schlagen vor, Enzyme nur dann als Kollagenasen zu bezeichnen, wenn sie ausschließlich Kollagen angreifen. Wenn ein kollagenspaltendes Enzym in geringem Maße auch auf andere Proteine einwirkt, sollte es "kollagenolytisches Enzym" genannt werden. Im Lichte dieser Definition wäre ein Enzym dann als Kollagenase einzustufen, wenn es ausschließlich Kollagen spaltet und kein anderes Protein angreift, in die Gruppe der kollagenolytischen Enzyme wären solche Enzyme einzuordnen, die neben einer spezifischen Kollagenspaltung einen geringen unspezifischen Nebeneffekt aufweisen. Ein Enzym, das neben einer Vielzahl von Proteinen auch Kollagen andaut, müßte als unspezifische Protease bezeichnet werden.

3.2.2. Historisches

Die Erforschung des enzymatischen Kollagenabbaues wurde durch viele methodische und experimentelle Unzulänglichkeiten sehr erschwert. In der vorantibiotischen Ära bereiteten sowohl die keimfreie Aufbereitung von Kollagensubstrat als auch die sterile Verarbeitung der zu untersuchenden Organe große Schwierigkeiten. In vielen Fällen wurde kein natives Kollagen zur Testung benutzt, eine bakterielle Kontamination war nicht exakt genug ausgeschlossen. Deshalb konnten zahlreiche Kollagenaseaktivitäten, die in früheren Jahren beschrieben wurden, einer späteren Überprüfung nicht standhalten. Ende des vorigen Jahrhunderts war bereits bekannt, daß anaerob gezüchtete Clostridien Sehnenkollagen (43) verdauen können. Dieser Befund geriet in Vergessenheit und wurde erst von Maschmann (44) wieder aufgegriffen, der die Kulturfiltrate von verschiedenen Clostridienstämmen mit enzymologischen Methoden untersuchte und

erste erfolgreiche Reinigungsschritte unternahm.

Die Enzyme aus *Clostridium perfringens*, *Cl. histolyticum* und *Cl. tetani* wurden später als echte Kollagenasen bekannt. Ein weiteres derartiges Enzym wurde in *Bacteroides melaninogenicus* (45) gefunden. Waldvogel und Schwarz beschrieben einen Stamm aus *Staphylococcus aureus* (46), der Kollagengewebe unter anaeroben Verhältnissen auflösen kann.

3.2.3. Die Clostridiopeptidase A

Die aus Kulturfiltraten von Clostridien isolierte Clostridiopeptidase A besitzt unter den Proteasen eine einmalige Substrat- und Bindungsspezifität. Das Enzym wurde zur Dispergierung von Zellen in Gewebekulturen, zur Behandlung von Brandwunden sowie zur Strukturaufklärung des Kollagens verwendet. Es spaltet natives Kollagen in den apolaren Bereichen, die die Sequenz -Gly-Pro-X-
-Gly-Pro-X- (47, 48, 49) besitzen, an der mit dem Pfeil bezeichneten Bindung. Diese Abschnitte der Kollagenfibrille sind enzymatischen Angriffen anderer Enzyme gegenüber außerordentlich stabil (50). Dieser Spaltungsort wurde von zwei Gruppen auf indirektem Weg bestätigt (51, 52). Sie füllten die durch Kollagenaseeinwirkung entstandenen Kollagenbruchstücke als SLS-Segmente aus und untersuchten sie elektronenmikroskopisch. Übereinstimmend fanden sie eine Aufhellung des Hellstreifens.

Um die Aktivität der Clostridiopeptidase bequemer und schneller bestimmen zu können, versuchte Wunsch (53) ein dem Bau des apolaren Bereiches entsprechendes künstliches Kollagenasesubstrat zu synthetisieren. Ein erster Erfolg dieser Bemühungen war das Tetrapeptid Cho-Hydro-Gly-Gly-Pro-methylester, welches als geeignetes Substrat durch Graßmann et al. (54) bestätigt wurde. Die erwarteten Bruchstücke konnten chromatographisch eindeutig nachgewiesen werden, eine quantitative Auswertung mit der Ninhydrinreaktion war jedoch nicht möglich, da eine teilweise Zyklisierung zum Diketopiperazin eintrat. So wurde das Augenmerk jetzt darauf gerichtet, ein Peptid zu schaffen, das folgenden Anforderungen genügen sollte:

1. Das Peptidbruchstück muß beständig sein ($\rightarrow$ Ninhydrin)
2. Das Peptid muß eine gute Löslichkeit in schwach basischen Puffern besitzen.

Die Lösung des Problems brachte ein ebenfalls von Wunsch (55) hergestelltes Hexapeptid mit der Formel Cbo-Gly-Pro-Gly-Gly-Pro-Ala. Mit diesem Substrat haben Graßmann und Nordwig (54) eine quantitative Bestimmungsmethode entwickelt, die für bakterielle Kollagenasen hochspezifisch ist.

Da die Bestimmung mit dem Cbo-Hexapeptid verschiedene methodische Nachteile aufweist (die vor allem auf der Anwendung der Ninhydrinreaktion beruhen), wurde von Wunsch und Heidrich (56) ein neues Kollagenasesubstrat entwickelt.

Dieses Chromophorsubstrat mit der Formel Pz-Pro-Leu↓Gly-Pro-D-Arg (Pz=p-phenylazobenzoyloxycarbonyl-) wird von der Clostridiopeptidase A an der mit dem Pfeil bezeichneten Stelle gespalten. Eine sehr geringe Spaltung wurde auch mit Chymotrypsin erreicht. Das Peptidbruchstück Pz-Pro-Leu ist in organischen Lösungsmitteln zu lösen und kann photometrisch bei 320 m μ oder 440 m μ quantitativ bestimmt werden.

3.2.4. Enzymtypen von Cl. histolyticum

Durch die zahlreichen Reinigungsversuche der letzten Jahre, bei denen synthetisches wie natürliches Substrat zur Testung benutzt wurde, konnte man drei Typen von Enzymen im Kulturfiltrat von Cl. histolyticum auffinden.

Dem ersten Typ entspricht die schon erwähnte Clostridiopeptidase A. Sie ist inaktiv gegenüber Proteinen wie Casein oder Hämoglobin, spaltet natives Kollagen in gelöster wie in fibrillärer Form und die synthetischen Modellpeptide vom Typ (Gly-Pro-R)_n.

Zum zweiten Typ gehören Enzyme, die -zwar wesentlich langsamer- natives Kollagen spalten, dazu aber eine geringe Wirkung auf unspezifische Proteine besitzen. Die Modellpeptide werden von diesen Enzymen nicht gespalten. Ein derartiges Enzym wurde von Schaub und Strauch (140) entdeckt und "Kollagenase 2" genannt.

Zur dritten Gruppe (141) zählen Enzyme, die künstliches Substrat und denaturiertes Kollagen spalten, nicht aber natives Kollagen. Diese Gruppe muß von den beiden ersten klar abgegrenzt werden und darf im Sinne der vorherigen Definition nicht als kollagenolytisches Enzym klassifiziert werden.

Das Molekulargewicht des Enzyms beträgt 109000, das pH-Optimum liegt im Bereich von 6-8 (58), während Kunina (59) ein scharfes Maximum bei pH=7,2 fand. Da die Konformation des Enzyms von Calciumionen abhängig ist, wird die reversible Inhibierung durch EDTA und andere Chelatbildner gut verständlich (60). Eine irreversible Hemmung des Enzyms kann mit SH-Reagenzien erreicht werden. Seifter et al. (61) vermuteten, daß eine straffe Bindung des Cystein an das Enzymmolekül erfolgt, wahrscheinlich über einen Komplex mit einem Zinkatom, das zur Aktivität notwendig ist. In jüngster Zeit konnte mit radioaktiv markiertem Zn^{65} dieser Befund für die Clostridiopeptidase bestätigt werden. Durch BAL (2,3,-dimerkapto-propanol) konnte das Zn-Ion entfernt werden, was dazu führte, daß das Cystein nicht mehr von der Clostridiopeptidase gebunden wurde (Seifter et al.).

Sehr genaue Untersuchungen über die Stabilität der Clostridiopeptidase A in wenig gereinigtem Zustand stammen von Nordwig und Strauch (62). Sie fanden, daß Ca-Ionen eine unbedingte Forderung für Stabilität und Aktivität des Enzyms darstellen. Seifter et al. (1970) zeigten darüber hinaus, daß zusätzlich auch Zn-Ionen erforderlich sind, die in den katalytischen Prozeß direkt eingreifen.

3.2.5. Kollagenasen außerhalb des Bakterienreiches

Außerhalb des Bakterienreiches wurden echte Kollagenasen nur in Exkreten der Schmeißfliege (63) *Lucilia sericata* und in Dassel-fliegenlarven (64) entdeckt. Trotz intensiver Suche konnten lange Zeit Kollagenasen bei höheren Organismen nicht aufgefunden werden. Da grundsätzlich sämtliche biochemischen Reaktionen von Enzymen katalysiert werden, mußte es auch für den Kollagenabbau die entsprechenden Enzyme geben. Die gescheiterten Versuche, in Extrakten eine kollagenolytische Aktivität nachzuweisen, wurden verschiedenen gedeutet:

1. Das Enzym ist im Extrakt an das im Überschuß vorhandene, natürliche Substrat gebunden und hat deshalb auf zusätzlich angebotenes Kollagen keine Wirkung (65).
2. Das Enzym ist nur sehr kurze Zeit aktiv.

3. Das Enzym wird rasch inhibiert.

4. Das Enzym wird leicht durch andere Enzyme zerstört.

3.2.5.1. tadpole-Kollagenase

Um die im ersten Fall vorliegende Ursache auszuschalten, ersannen Gross und Lapiere (66) eine geniale Versuchsanordnung. Sie kultivierten Gewebe von Kaulquappen (*Rana catesbiana*), die bekanntlich während der Metamorphose eine hochgradige Degradation von Kollagen aufweisen, unter sterilen Bedingungen auf Gelen, die aus fibrillären, nativen Kollagen bestanden. Wenn nun die Kollagenase aus ihrer Enzym-Substrat-Bindung frei wird, könnte sie per diffusionem die Kollagenfibrillen erreichen und spalten. Die erwartete Auflösung des Kollagengels konnte innerhalb von 24-48 Stunden, bei neutralem pH und Temperaturen von 27° oder 37° tatsächlich beobachtet werden. Durch Ausmessung des kreisrunden Lysehofes ließen sich auch quantitative Aussagen machen.

Die bei Verwendung markierten Kollagens beobachteten radioaktiven Bruchstücke im Kulturmedium und eine erhebliche Menge kleiner hydroxyprolinhaltiger, dialysabler Peptide erhärteten diesen Befund. Eine beachtliche kollagenolytische Aktivität wurde in Kulturen von Haut, Darm und Kiemen gefunden. Dieser Effekt tritt nicht mehr auf, wenn die Gewebe durch Einfrieren und Auftauen abgetötet wurden oder dem Kulturmedium Hemmstoffe der Proteinbiosynthese (z. Bsp. Puromycin) beigegeben sind. Diese Tatsache deutet darauf hin, daß die Kollagenase nicht frei in der Zelle gespeichert wird (somit auch nicht ohne weiteres extrahierbar ist), sondern erst während der Inkubation synthetisiert wird. Mit anderen Organen wie z. Bsp. dem Schwanzmuskel oder Rückenmark konnte keine Auflösung von Kollagengel erreicht werden. Offensichtlich bewirken deren Rückbildung in vivo andere Enzyme.

Im Verlauf weiterer Arbeiten wurde die "tadpole"-Kollagenase 300-fach angereichert (67). Da keine Angaben über den erzielten Reinheitsgrad gemacht wurden, ist es schwer möglich zu entscheiden, ob die sehr geringe caseinolytische Restaktivität auf Verunreinigungen oder auf eine spezielle Eigenschaft des Enzyms zurückzuführen ist.

Im pH-Bereich von 8-9 entfaltet das Enzym seine größte Aktivität. Durch EDTA wird es inhibiert, kann aber durch Ca-Ionen reaktiviert werden. Irreversibel geschädigt wird es durch Cystein, von DFP wird es nicht beeinflusst. Eine zehn Minuten lange Erwärmung des Enzyms auf 50° - 60° C führt zum völligen Wirkungsverlust. Nach etwa zweistündiger Einwirkung bei 20° C auf Kollagenlösungen verringert sich die Viskosität um 40-50 %. Eine Zugabe von frischem Enzym zeigt keinen Effekt. Die diskoelektrophoretische Analyse des Reaktionsgemisches, elektronenmikroskopische Untersuchungen von SLS-Segmenten (68) und fraktionierte Ammonsulfatfällung (69) zeigten, daß das Kollagen an einer einzigen Stelle quer durchgespalten wird. Die resultierenden Bruchstücke TC^A und TC^B besitzen eine helikale Struktur, ihre Größe entspricht $3/4$ bzw. $1/4$ der ursprünglichen Gesamtlänge des Moleküls. An der C-terminalen Spaltstelle wurde Glycin, an der N-terminalen Leucin oder Isoleucin gefunden.

3.2.5.2. Säugetierkollagenasen

Mit der Entdeckung der "tadpole"-Kollagenase brach eine neue Epoche der Kollagenchemie an. Mit der neuen Technik wurden bald auch bei Säugetieren kollagenolytische Enzyme entdeckt, die fast alle sehr große Ähnlichkeit zu der klassischen Kollagenase besitzen. Dies gilt besonders für die Art ihrer Spaltung.

Kollagenasen des Knochens

Die Knochenresorption ist ein sehr vielschichtiger Vorgang. Enzyme, die das osseäre Kollagen abbauen können, wurden zuerst von Walker et al. (70) aufgefunden. Mit kultivierten Metaphysen von Rattenknochen konnten sie in vitro eine Kollagenolyse beobachten. Einen derartigen Effekt konnte Fullmer und Lazarus (71) mit der gleichen Technik auch bei mehreren Knochen- und Knorpelgeweben von Ratte, Ziege und Mensch feststellen. Oftmals lassen sich die Enzymausbeuten durch Zugabe von Parathormon steigern. Das pH-Optimum liegt zwischen 7-8, die Spaltungsweise stimmt mit der der tadpole Kollagenase überein.

Mehreren Arbeitsgruppen gelang es, auch in Knochenhomogenaten kollagenolytische Enzyme nachzuweisen. Ein von Woods und Nichols (72)

beschriebenes Enzym - wahrscheinlich lysosomaler Herkunft - spaltet Kollagen bevorzugt bei schwach saurem bis neutralem pH-Wert. Aer und Kivirikko (73) entdeckten ein Enzym in Rattenknochen, das im Bereich von $\text{pH} = 7$ Kollagen zu großen Bruchstücken (bisher noch nicht genau charakterisiert) abbaut. Diese bei Säugetieren gemachten Beobachtungen wurden durch neueste Untersuchungen von Lapiere und Vaes weiter untermauert. Es bleibt jedoch noch abzuklären, inwieweit diese Effekte nicht auf leukozytäre Enzyme des Knochenmarkes zurückzuführen sind (74).

Kollagenasen der Leukocyten

Um die Funktion als bewegliches Abwehr- und Aufräumsystem im Körper erfüllen zu können, verfügen die Leukocyten über ein buntes Mosaik proteolytischer Enzyme. Lazarus et al. (75) gelang es in Extrakten menschlicher, polymorphkerniger Granulocyten (nicht aber Lymphocyten) eine Kollagenase nachzuweisen und zu reinigen. Dieses Enzym benötigt Ca-Ionen zur vollen Aktivität, durch EDTA und Cystein wird es inhibiert, bei einem pH-Optimum von 7,8 spaltet es nach Art der tadpole-Kollagenase. Die Zugabe von Serum unterbricht die Reaktion nicht, verhindert aber den weiteren Abbau der Kollagenfragmente.

Kollagenasen der Haut

Die Annahme, daß es in der Haut spezifische Enzyme für den Kollagenabbau gebe, konnten erstmals Eisen et al. (76) bestätigen. In den Medien kultivierter menschlicher Haut fanden sie eine sehr bemerkenswerte Kollagenase. Dieses Enzym baut Kollagen in der nämlichen Weise ab wie die Enzyme der Kaulquappe, des Knochens und der Granulocyten (77). Durch Zugabe menschlichen Serums wird es inhibiert. Selbst bei 24-stündiger Einwirkung auf fibrilläres Kollagen bei 37°C entstehen keine dialysierbaren Reaktionsprodukte. Außerdem ist das Enzym frei von jeglicher Einwirkung auf andere Proteine. Bauer et al. hatten Erfolg in ihren Bemühungen, dieses Enzym zu reinigen. Dieses Material benutzten sie zur Immunisierung von Ratten. Mit den Methoden der Immundiffusion und der Enzyminhibierung wurde eine Kreuzreaktion von Kollagenasen verschiedener menschlicher Gewebe beobachtet. Mit Hilfe dieses Antikörpers war es auch möglich, mehrere Kollagenasen zu entdecken, die sich in

ihrem Molekulargewicht unterscheiden.

Darüber hinaus wurde über Kollagenasen in der erkrankten oder verletzten Haut berichtet. Es bleibt noch zu klären, ob sie sich von den in der normalen Haut vorkommenden Enzymen unterscheiden.

Kollagenasen des Uterus

Eine Verminderung von Muskulatur und Bindegewebe erheblichen Ausmaßes findet im postpartalem Uterus statt. Als ein dabei wirksamer Faktor wurde von mehreren Forschergruppen (78,79) mittels Gewebekultur eine Kollagenase gefunden. Diese wird von EDTA irreversibel inhibiert, Cystein übt keinen Einfluß auf die Aktivität aus. Bei einer Temperatur von 28°C baut sie Kollagen zu mehreren großen Bruchstücken ab, bei 37°C werden die meisten Reaktionsprodukte dialysierbar.

Kollagenasen der Cornea

Zuerst entdeckte Itoi (80) eine Kollagenase in der Rattencornea. Sie ist nur in der Kultur des vorderen Hornhautepithels zu beobachten, Versuche mit dem lamellärem Bindegewebe der Substantia propria und dem Hornhautendothel führten zu negativen Ergebnissen. Über etwas andere Befunde berichten Brown und Weller (81); ihnen gelang der Kollagenasenachweis nur in der tiefgreifend verletzten Cornea. Eine erhebliche Kollagenaseproduktion wurde auch in der Umgebung von Corneaulcera (82,83) festgestellt. Sie soll hier als ein maßgeblicher pathogenetischer Faktor wirksam sein. Deshalb werden in jüngster Zeit auch Kollagenaseinhibitoren zur Therapie des Ulcus corneae eingesetzt (84,85).

Kollagenasen der Gingiva

Die Theorie, daß bei Erkrankungen des Zahnhalteapparates eine enzymatische Destruktion von Kollagen beteiligt sei, erfuhr durch jüngste Ergebnisse eine starke Stütze (86). Kultiviertes Gewebe der Gingiva von Patienten mit entzündlichen Zahnfleischerkrankungen löste Kollagenase auf, während normales Gewebe dazu nicht in der Lage war. Bei der Periodontitis und der nekrotisierenden Gingivitis können die kollagenolytischen Enzyme auch in den Extrakten nachgewiesen werden. Bei chronischen Entzündungsformen kön-

nen jedoch kollagenolytische Effekte nur durch die Gewebekultur erreicht werden. Da mit dem Übergang einer akuten in eine chronische Entzündungsform auch eine Veränderung der infiltrierenden Zellen (von Granulocyten zu Lymphocyten) einhergeht, liegt der Verdacht sehr nahe, daß hier zum Teil Kollagenasen aus Granulocyten (S.16) erfaßt worden sind.

Kollagenasen des Synoviums

Eine wichtige Rolle spielt die Kollagenase bei der rheumatischen Arthritis. Sie konnte im Kulturmedium pathologischer Synovien (87) aufgefunden werden und entspricht hinsichtlich ihres pH-Optimums, der Einflüsse von Inhibitoren und der Spaltungsweise den anderen tierischen Kollagenasen. Die beobachtete Stimulation mit Colchizin ist bislang noch völlig ungeklärt. Zu positiven Ergebnissen führten auch Versuche mit Synovien anderer Gelenkserkrankungen (88,89), in normalem Gewebe konnte das Enzym jedoch nicht gefunden werden (90). In weiterführenden Untersuchungen von Harris et al. (91) wurden zwei Kollagenasen unterschiedlichen Molekulargewichts voneinander abgetrennt, von denen nur die leichtere mit Serum inhibierbar ist.

In Zusammenfassung der beschriebenen Enzyme neigt man sehr dazu, von einem einheitlichen Typ der animalen Kollagenasen zu sprechen, der wohl im Einzelfall etwas variieren kann. Die gemeinsame Spaltungsweise unterscheidet diese Enzyme klar von den bakteriellen Kollagenasen mit der Spezifität der Clostridiopeptidase A. Obgleich die synthetischen Substrate ursprünglich zur leichteren Erfassung, quantitativen Auswertung und Reinigung der Clostridiopeptidase entwickelt wurden, setzten mehrere Forschergruppen diese auch zur Bestimmung von kollagenolytischen Enzymen bei Säugtieren ein.

3.2.6. Mit künstlichem Substrat getestete kollagenolytische Enzyme

Enzyme, die künstliche Kollagensubstrate umsetzen, wurden in verschiedenen Geweben der Ratte (92), in Zellkulturen menschlicher HeLa-Zellen (102), in Mäusefibroblasten, in der Leber, Haut und Knochenzellen von Hühnerembryonen (93), in der Leber und Milz von

Ratten (94), in der Schweineaorta (95), im Rindermuskel (96), in menschlichen Seren (97) und kariösen Zähnen (98) gefunden. Etwas zu voreilig wurden diese Enzyme in Analogie zum bakteriellen Bereich als Kollagenasen bezeichnet.

Mehrere Arbeitsgruppen (99,100,101) berichteten über Peptidasen, die zwar das Modellpeptid, nicht aber natives Kollagen spalten. Gemäß der Definition "Spaltung nativen Kollagens unter physiologischen Bedingungen" erscheint die Klassifizierung Pz-Penta-Peptid spaltender Enzyme als Kollagenasen äußerst fragwürdig. Kann das Pz-Penta-Peptid stellvertretend für natives Kollagen-substrat dienen oder anders formuliert: werden bei Säugetieren das Kollagen und das synthetische Peptid von denselben Enzymen gespalten?

4. Aufgabenstellung

Es war also das Anliegen dieser Arbeit zu untersuchen, welche Enzyme mit dem Pz-Penta-Peptid erfaßbar sind, diese anzureichern und zu charakterisieren. Darüber hinaus sollte der Versuch unternommen werden, am gleichen Versuchsobjekt Kollagenasen im Sinne der oben gegebenen Definition (S.10) nachzuweisen. Ein Vergleich der mit künstlichem und natürlichem Substrat erzielten Ergebnisse sollte eine eindeutige Aussage über den Wert synthetischer Kollagenasesubstrate ermöglichen.

Als Untersuchungsobjekt diente die Haut junger, weißer Mäuse. Für dieses Gewebe wurden zunächst Kulturbedingungen ausgearbeitet und die Vitalität der Zellen genau bestimmt.

Im nächsten Arbeitsgang wurde die Proteinkonzentration, die enzymatische Lyse nativen Kollagens und die Spaltung des Pz-Penta-Peptids der täglich aus der Kultur abgekippten Medien ermittelt. Der Anreicherung des kollagenolytischen Enzyms folgte dann die Isolierung des Pz-Penta-Peptid spaltenden Enzyms. Abschließend wurde das Molekulargewicht, pH-Optimum, die Michaelis-Menton-Konstante, die Abhängigkeit von Calciumionen, die Wirkung von Serumproteinen und der Angriff auf natives Kollagen des neu isolierten Enzyms bestimmt.

Durch diesen Versuchsgang ist es gelungen, die Aufgabenstellung zu erfüllen und damit in Zusammenhang stehende Fragen zu beantworten.

II. Ergebnisse

1. Quantitativer Nachweis von Enzymaktivitäten im Verlauf der Kultivierung

1.1. Die Gewebekultur

1.1.1. Versuchsansatz (129)

Zur Gewebekultur wurden die Häute 3-5 Tage alter, weißer Mäuse des NMRI-Stammes verwendet. In diesem Alter sind die Tiere noch haarlos, wodurch die bakterielle Kontamination geringer wird. Die enorme Stoffwechselaktivität des postembryonalen Gewebes stellt einen weiteren Vorteil dar. Zur Säuberung und Desinfektion wurden die Tiere mit 70 % Isopropylalkohol gewaschen und für kurze Zeit (etwa 10 min.) mit UV-Licht bestrahlt. Anschließend wurden sie durch Dekapitation getötet und die Haut unter sauberen Bedingungen abgezogen. Bis zum Ende dieses Arbeitsganges befanden sich die Hautstückchen in einem temperierten Medium (37°C) mit doppelter Antibiotikakonzentration. Bevor das Gewebe unter sterilen Bedingungen mit der Schere zerkleinert wurde, erfolgte durch häufiges Wechseln des Mediums (4-5 mal) eine weitere Reinigung. Der dabei anfallende Zelldendritus wurde durch mehrmaliges Zentrifugieren bei 1000 UpM von den 2-4 mm großen Hautstücken entfernt. Danach wurde das Gewebe zur Kultivierung in Breed-Demeter-Vierkantflaschen überführt.

1.1.2. Das Nährmedium (130, 131)

Da Epidermis und Stratum reticulare des Coriums selbst gefäßlos sind, werden sie in vivo über angrenzende Kapillarnetze per diffusionem mit den notwendigen Substanzen versorgt. Die Unterbrechung des Blutkreislaufs in vitro führt dazu, daß sich die Diffusionsverhältnisse sehr verschlechtern. Für diese Art des passiven Stofftransportes gilt das Ficksche Gesetz, das in vereinfachter Form lautet:

$$\frac{Q}{t} = D \cdot F \cdot \frac{\Delta c}{d}$$

Es besagt, daß die pro Zeiteinheit (t) transportierte Menge (Q) abhängig ist von der Austauschfläche (F), von dem Konzentrationsgradienten (Δc), der Diffusionsstrecke (d) und dem Diffusionskoeffizienten (D). Um ein ausreichendes Gefälle der Nährstoffe in Richtung zur Zelle zu erreichen und eine Anhäufung der Metabolite zu verhindern, wurde das Nährmedium täglich gewechselt.

Das Nährmedium muß mehreren Bedingungen in optimaler Weise entsprechen:

1. Es muß alle Stoffe enthalten, die die Zellen für biochemische Leistungen benötigen,
2. Die Zusammensetzung der Ionen muß der des extrazellulären Raumes entsprechen (Isoionie),
3. Es muß den physiologischen Wert des osmotischen Druckes von 0,33 mosmol aufweisen (Isotonie),
4. Es muß die physiologischen pH-Verhältnisse aufrechterhalten.

In vivo wird dieser Wert von 7,3 - 7,4 im wesentlichen durch einen Kohlensäure/Alkalikarbonatpuffer gehalten (Isohydrie). Aus einer Reihe von Lösungen, die diese Bedingungen erfüllen, wurde das von Dulbecco modifizierte Eaglesche Medium (DMEM) ausgewählt. Es wurde bereits mit Erfolg von Eisen et al. (76) zur Kultivierung menschlicher Haut verwendet.

COMPONENTS	mg./liter	COMPONENTS	mg./liter
AMINO ACIDS		OTHER COMPONENTS	
L-Arginine HCl	84.0	Glucose	1000.00
Glycine	30.0	Phenol Red	15.0
L-Glutamine	580.0*		
L-Cystine	48.0	INORGANIC SALTS	
L-Histidine HCl · H ₂ O	42.0	CaCl ₂	200.00
L-Isoleucine	105.0	KCl	400.00
L-Leucine	105.0	MgSO ₄ · 7H ₂ O	200.00
L-Lysine HCl	146.0	NaCl	6,400.00
L-Methionine	30.0	NaHCO ₃	3,700.00
L-Phenylalanine	66.0	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	124.00
L-Serine	42.0	Fe(NO ₃) ₃ · 9H ₂ O	0.10
L-Threonine	95.0		
L-Tryptophan	16.0		
L-Tyrosine	72.0		
L-Valine	94.0		
VITAMINS			
D-Ca-Pantothenate	4.00		
Choline Chloride	4.00		
Folic Acid	4.00		
β-Inositol	7.20		
Nicotinamide	4.00		
Pyridoxal HCl	4.00		
Riboflavin	0.40		
Thiamine HCl	4.00		

Vialed at pH 7.2 to 7.4.

* L-Glutamine is omitted from our formulation.

In der angewandten Suspensionstechnik vermehren sich die Zellen nicht. Im Gegensatz zu dieser Methode kann eine Zunahme der Zellzahl durch Teilung erfolgen, wenn das Medium Serumproteine enthält. Die Zellen breiten sich in monozellulärer Schicht über die Glasoberfläche aus, erreichen dann den Glasrand und teilen sich infolge der Kontaktinhibition nicht mehr weiter. Dieses für viele Problemstellungen hervorragend geeignete System findet in den auf enzymatischen Kollagenabbau gerichteten Arbeiten keine Anwendung, erstens, weil die rasante Zellvermehrung mit darauffolgendem Teilungsstillstand den Verhältnissen in vivo nicht sehr nahe kommt, und zweitens, weil die meisten Kollagenasen durch Serumproteine inhibiert werden.

Eine Begasung mit einem Luft/CO₂-Gemisch (95% : 5%) wurde unterlassen, da dadurch zusätzliche pH-Schwankungen entstehen. Die zu Beginn der Inkubation auftretenden pH-Abweichungen zur sauren Seite wurden durch Zugabe steriler 2,8 % Natriumbikarbonatlösung korrigiert.

Unter Berücksichtigung der potentiell toxischen Wirkung kann man durch geeignete Dosierung mit Antibiotika eine weitgehende Keimfreiheit aufrechterhalten. Die Zugabe von 100 I.E. Penicillin G/ 1 ml und 100 µg Streptomycinsulfat / 1 ml reichten in der angegebenen Konzentration zur vollen Bakteriostase bzw. Bakterizidie aus. Es ist bekannt, daß diese Mengen die Kulturen von Haut und Fibroblasten nicht schädigen (102,103,104).

1.2. Die Vitalität der Zellen

Für die Interpretation und Bedeutung der Versuchsergebnisse, die mit der Gewebekultur gewonnen werden, spielt die Frage der Vitalität der Zellen eine entscheidende Rolle. Sie wurde mit drei verschiedenen Untersuchungen beantwortet.

1.2.1. Die lysosomalen Enzyme

Beim Zelluntergang geben die Lysosomen (105,106) ihre Enzyme an die Umgebung ab und bewirken die Selbstverdauung (Autolyse). An diesem Geschehen sind neben vielen anderen Enzymen auch die saure

Phosphatase (107,108), die β -Glukuronidase (109,110) und die N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase (111) beteiligt. Das Auftreten der letzteren, lysosomenspezifischen Enzyme im Nährmedium stellt somit einen empfindlichen Indikator für den Zelltod dar. Im Diagramm (Abb.3) sind die Enzymaktivitäten aufgetragen, die in den täglich gewechselten Nährmedien bestimmt wurden.

(Versuch 1)

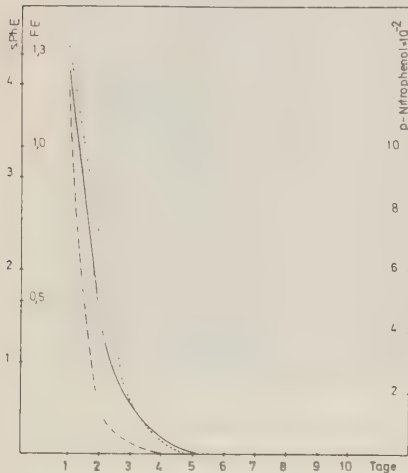


Abb.3: Aktivität von lysosomalen Enzymen im täglich abgekippten Medium. Abszisse: Inkubationstag; Ordinate: gestrichelt = s-Phosphat. gepunktet = β -Glukuronidase. ausgezogen = β -D-Glucosaminidase

Die hohen Anfangswerte sind eine Folge der massiven Gewebszerstörung, die mit der Aufarbeitung der Haut (Zerkleinern, Waschen, Zentrifugieren) einhergeht. Am fünften Tag sinken die Enzyme unter die Nachweisgrenze ab und treten im weiteren Verlauf der Kultur nicht wieder in Erscheinung.

1.2.2. Elektronenmikroskopie

Recht charakteristische Veränderungen spielen sich während des Zellunterganges am Kern ab. Die Kernstruktur wird zuerst undeutlich, die Kernmembran infolge Schrumpfung entspannt und dadurch gewellt. Das Chromatin kann aufgelöst werden (Karyolyse) oder unter Depolymerisierung der Nukleotide zu einem intensiv gefärbten Klumpen zusammensintern (Kernpyknose). In anderen Fällen zerfällt der Kern in Chromatinbrocken (Karyorhexis), die sich der Kernmembran

auflagern. Dadurch wird sie verstärkt anfärbbar (Kernwandhyperchromasie). Am schönsten sind diese Veränderungen im Elektronenmikroskop zu sehen (112). (Versuch 2)

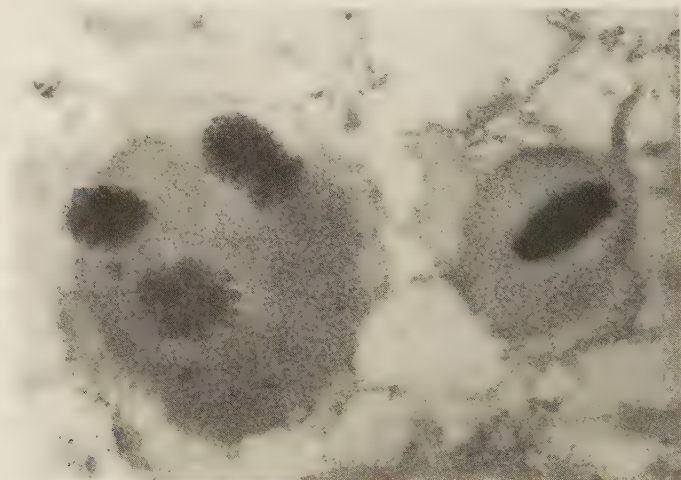


Abb.4: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Gewebestückchens der Mäusehaut. Vergrößerung 50.000 fach, photographisch 2,2 fach nachvergrößert.

Das Foto zeigt zwei Zellkerne von Hautstückchen, die neun Tage in der Gewebekultur gezüchtet worden waren. Obgleich diese Aufnahme nicht sehr geglückt ist, kann man doch feststellen, daß die Kerne einen gleichmäßigen, einheitlichen Grauton besitzen und weder Spaltbildungen noch eine erhöhte Anfärbbarkeit der Kernmembran besitzen. Dieses morphologische Untersuchungsergebnis kann als ein weiterer Hinweis auf die Vitalität der Zellen gewertet werden.

1.2.3. Züchtungsversuch

Es versteht sich, daß die Zellteilung mit ihren vielschichtigen Vorgängen in Kern und Zytoplasma nur in absolut intakten Zellen stattfinden kann. Durch Zugabe von Serumproteinen (5%) zu den Medien ist es möglich, lebende Kulturen mit konstanter Zellzahl zur

Teilung und Vermehrung zu bringen.

Zu den im stationärem System kultivierten Hautstückchen wurde am 10. Inkubationstag der Nährlösung inaktiviertes Kälberserum zugesetzt. Nach 1-2 Tagen sieht man im Mikroskop (Abb.5) das typische Bild der sich vermehrenden Fibroblastenkultur.

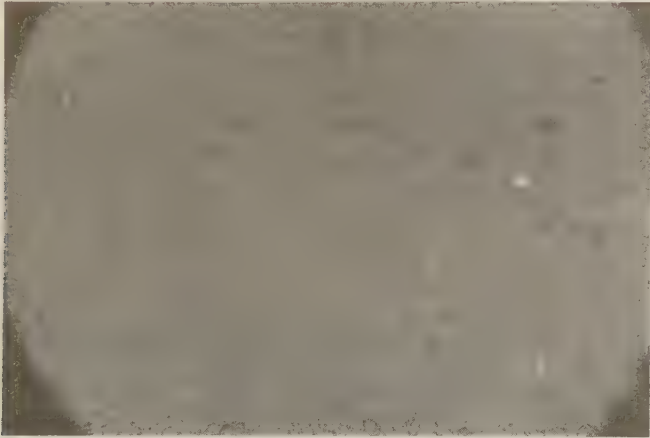


Abb.5: Fotographische Aufnahme einer Fibroblastenkultur.
Vergrößerung 50-fach;

Durch die Ergebnisse der enzymatischen, morphologischen und kulturellen Untersuchungen steht die Vitalität der Zellen eindeutig fest. Die Bedingungen *in vitro* genügen voll den gestellten Anforderungen.

1.3. Sterilitätskontrolle

Da es Bakterien gibt, die selbst bei hoher Antibiotikakonzentration nicht zugrunde gehen (=resistente Keime), wurden während der Kultivierung gesonderte Sterilitätsproben (Versuch 3) durchgeführt. Dazu wurde mit einer Öse ein Tropfen Medium auf einer Kochblutplatte ausgestrichen und bei 37°C mehrere Tage bebrütet. Das Ergebnis war durchwegs negativ. Der selten aufgetretene Pilzbefall in den Kulturen war bereits mit bloßem Auge deutlich zu erkennen. Es erübrigt sich zu erwähnen, daß diese sofort vernichtet wurden.

Das Medium wurde täglich unter sterilen Bedingungen abgekippt und durch 3 μ -Filtration (Sartorius Membranfilter) für die Versuche aufbereitet. Das Filtrat ist absolut zellfrei (Vergleich: Größe eines Erythrocyten 8 μ), doch kann es kleine Zellpartikel wie Ribosomen enthalten, die aber in keiner Weise stören.

1.4. Proteinbestimmung im abgekippten Medium

Als erster Parameter wurde die Proteinkonzentration des täglichen Dekantats bestimmt (Versuch 4). Sie ist von Bedeutung, weil die meisten Enzymaktivitäten auf diese Größe bezogen werden. Das Verhältnis Enzymaktivität zu Proteinmenge wird als spezifische Aktivität bezeichnet.

Zur Prüfung des Proteingehaltes bieten sich mehrere Methoden an. Sehr einfach durchzuführen ist die Extinktionsmessung bei 280 $m\mu$, doch werden die Meßwerte durch die ebenfalls in diesem Bereich absorbierenden Nukleinsäuren sehr gestört. Die Ultramikrostickstoffmethode nach Strauch läßt sich nicht anwenden, da die Konzentration an niedermolekular gebundenen Stickstoff (z.Bsp. Aminosäuren und Antibiotika) in dem Medium zu hoch ist. Die Biuretmethode nach Beisenherz besitzt eine untere Nachweisgrenze von 5 mg/ml und ist damit zu unempfindlich.

Aus diesen Gründen wurde auf eine Modifikation der Methode nach Folin-Ciocalteus (O.Folin und V.Ciocalteus 1927; M.Schaub 1967) zurückgegriffen. Ein blauer Farbstoff, der von der Reduktion einer Phosphormolybdat-Phosphorwolframat-Reagenzlösung (Folin-Ciocalteus-Reagenz) durch die zyklischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan der Proteinlösung herrührt, wird colorimetrisch ausgewertet. Die Methode erfaßt einen Bereich von etwa 50-500 μ m Protein/ml; Proben mit höherem Proteingehalt müssen entsprechend verdünnt werden.

Die ermittelte Proteinkurve (Abb.6) zeigt einen exponentiellen Verlauf. Er läßt sich folgendermaßen interpretieren: Wegen der starken mechanischen Gewalteinwirkung bei der Aufarbeitung des Gewebes gelangt Cytoplasma von geschädigten Zellen in das umgebende Medium. Beim täglichen Wechsel der Nährlösung wird es nach und nach ausgewaschen, die Proteinkonzentration sinkt.

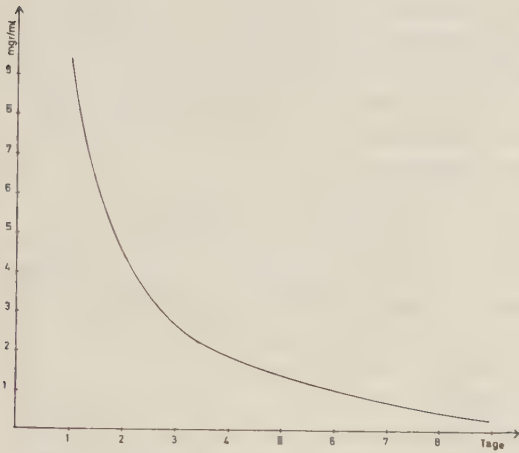


Abb.6: Proteinkonzentration im Verlauf der Kultivierung. Absz.: Zeit in Tagen; Ord.: Proteinkonzentration

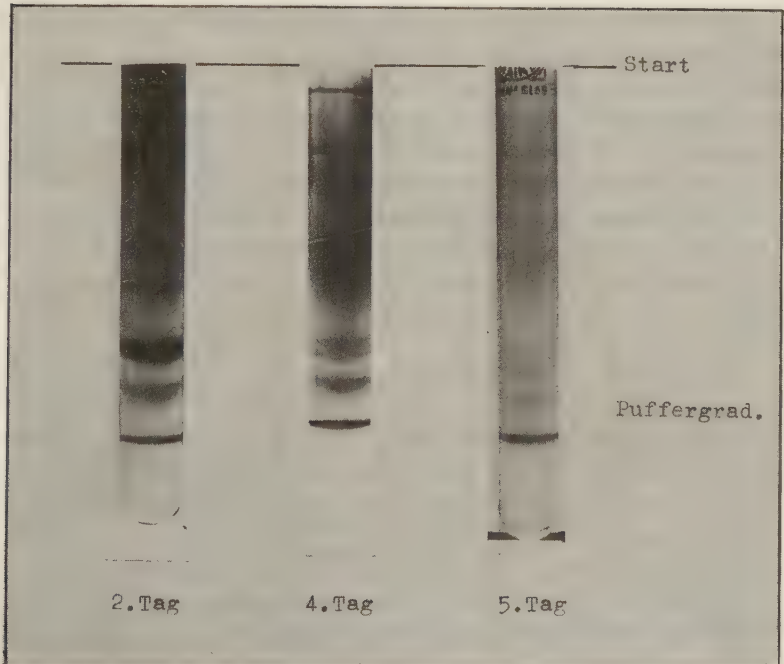


Abb.7: Diskelektroph. von zu verschiedenen Zeiten abgek. Medien.

Um sich ein Bild des Proteinmusters machen zu können, wurden die Medien diskelektrophoretisch analysiert (Versuch 5). Die zahlreichen Banden (Abb. 7) sind wegen des intensiv gefärbten Hintergrunds nur sehr unscharf und undeutlich zu sehen. Die sukzessive Abschwächung der Banden bestätigt den oben vermuteten Auswascheffekt. Neu auftretende Banden lassen sich bei der Analyse des Rohmaterials nicht mit Sicherheit erkennen.

1.5. Kollagenasebestimmung mit nativem Kollagensubstrat

Zur Bestimmung von Kollagenasen stehen mehrere Methoden zur Verfügung.

1.5.1. Die Hydroxyprolinbestimmung

Wie bereits in der Einleitung (S. 5) erwähnt, kann die Aminosäure Hydroxyprolin als Markersubstanz für Kollagen verwendet werden. Die unmittelbare Bestimmung der kollagenolytischen Aktivität im Medium beruht auf folgender Grundlage:

Treten im Verlauf der Kultivierung irgendwann kollagenolytische Enzyme auf, so werden diese das reichlich vorhandene Kollagen der Haut angreifen. Als Folge des Kollagenabbaues müßten hydroxyprolinhaltige Fragmente in der täglich gewechselten Nährlösung nachweisbar werden. Um dieses niedermolekulare Material von den höhermolekularen Proteinen abzutrennen, wurde das Medium mit Trichlor-

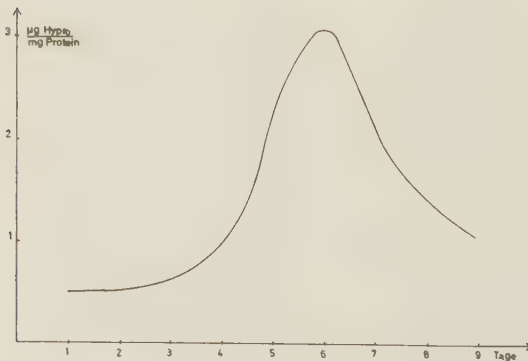


Abb. 8: Hydroxyprolinbestimmung im Medium nach TCA-Fällung.
Absz.: Zeit in Tagen,
Ord.: Hypo-Konzentr.

essigsäure (15 % = Endkonzentration) gefällt. Das im Supernatant verbleibende Hydroxyprolin wurde nach einem von H. Stegemann (113) angegebenen Verfahren bestimmt. Es beruht auf folgendem Prinzip: (Versuch 6)

Die Proben (Überstand des TCA-gefällten Mediums) wurden in Salzsäure total hydrolysiert und die Säure nach dem Aufschluß im Rotavapor abgedampft. Nach Zugabe von Wasser und Adsorption störender Begleitstoffe an Aktivkohle, erfolgte mittels Chloramin T die Umwandlung des Hydroxyprolins in Pyrrol. Letzteres kann mit p-Dimethylaminobenzaldehyd colorimetrisch nachgewiesen werden.

In der Abb. 8 ist auf der Ordinate der Hydroxyprolingehalt pro Volumeneinheit bezogen auf das Gesamtprotein/Volumeneinheit aufgetragen. Die Kurve steigt von sehr niedrigen Anfangswerten am 4. und 5. Tag steil an, erreicht am 6. Tag ihr Maximum und fällt danach wieder rasch ab.

1.5.2. Radioaktive Kollagenbestimmung

Eine sehr elegante Methode wurde 1966 von Nagai et al. (114) angegeben. Sie fällten mit radioaktiv markierten Kollagen Gele aus. Nach Zugabe von kollagenolytischem Enzym können die radioaktiven Fragmente vom Gel abdiffundieren und in Lösung gehen. Durch scharfes Zentrifugieren werden Überstand und Gel vollständig voneinander getrennt. Die Radioaktivität des Überstandes kann im Liquid Scintillation Counter (Packard) quantitativ bestimmt werden (Versuch 7). Sie stellt ein Maß für die Enzymaktivität dar.

Herstellung markierten Kollagens

Da radioaktives Kollagen nicht in den Chemikalienkatalogen verzeichnet ist, mußte es selbst hergestellt werden (Versuch 8). Zu diesem Zweck wurden wachsende Meerschweinchen (180-200 gr) mit C^{14} -Glycin gespritzt. Tiere in diesem Alter besitzen einen erhöhten Anteil an extrahierbarem Kollagen. Grundsätzlich standen zur Markierung die Aminosäuren Glycin und Prolin (Hydroxyprolin wird ja bekanntlich nicht eingebaut) zur Auswahl. Da Glycin zu etwa 33 % im Kollagen vertreten ist, war mit dieser Aminosäure die

höchste Markierung zu erwarten. Ein Nachteil, der dabei in Kauf genommen werden mußte, ist die Tatsache, daß Glycin außer in Kollagen noch in andere Proteine inkorporiert wird.

Die Ausbeute an radioaktiv markierten Kollagen wird im wesentlichen durch die Applikationsform des Isotops und den Zeitpunkt des Abtötens der Tiere bestimmt. Die sicherste und schnellste Resorb-

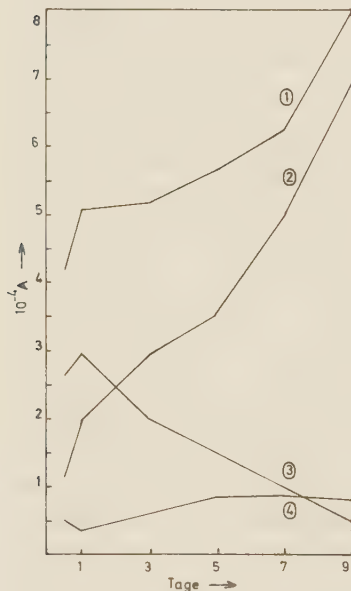


Abb. 9: Totale und partielle Radioaktivität ($A = \text{Ip/m}/100 \text{ mg Gesamt-kollagen}$) der einzelnen Kollagenfraktionen zu bestimmten Zeiten nach C^{14} -Gaben bei Ratten.

Absz.: Zeit

Ordin.: 1. Gesamtaktivität

2. Aktivität des ULK

3. Aktivität des NLK

4. Aktivität des SLK

tion wird durch die intraperitoneale Injektion erreicht. Nach 6 Stunden, wenn die Markierung in der neutralsalzlöslichen Fraktion (NLK) des Kollagens ihr Maximum erreicht, werden die Tiere getötet. Verstreicht dieser Zeitpunkt, so geht die Radioaktivität in die säurelösliche (SLK), hauptsächlich aber in die unlösliche Kollagenfraktion (ULK) über. Schon 12 Stunden nach der Glycingabe sind 30 % der Totalaktivität im unlöslichen Kollagen zu finden. Diese Aussagen seien durch Abb. 9 (aus K. Kühn 115) belegt.

Die neutralsalzlösliche Kollagenfraktion wurde zweimal extrahiert, die erzielte Markierung betrug 10700 cpm/mg Kollagen. Die mengenmäßig weitaus überwiegende säurelösliche Fraktion wurde durch drei Extraktionen gewonnen und wies eine spezifische Aktivität

von 500 cpm/mg Kollagen auf. Für die Enzymbestimmungen wurden die Chargen so vereinigt, daß sich eine Aktivität von 1700 cpm/mg Kollagen ergab.

Die Brauchbarkeit eines radioaktiven Kollagensubstrates hängt neben einer ausreichenden Markierung auch von der Widerstandsfähigkeit gegenüber unspezifischen Proteasen ab. Sie wird durch eine partielle oder totale Denaturierung im Verlauf der Herstellung stark vermindert.

Deshalb wurden im üblichen Versuchsansatz Kontrollen mit kristallinem, hochaktiven Trypsin mitgeführt. Bei einem Enzym/Substratverhältnis von 1:10 konnte es nicht mehr als 5 % der im Kollagengel eingesetzten Radioaktivität in Lösung bringen.

Neben den unspezifischen Proteasen können auch noch andere Faktoren die Radioaktivität des Supernatans erhöhen und somit ein kollagenolytisches Enzym vortäuschen. Diese sind chemisch-physikalischer Natur und ändern die Festigkeit der gelierten Kollagenfibrille (116). Zur näheren Erläuterung sei hier kurz der Mechanismus der Fibrillenbildung *in vitro* erwähnt.

Fibrillen nativen Typs entstehen *in vitro* durch Dialyse von Kollagenlösungen entweder gegen Wasser oder gegen verdünnte, leicht alkalische Puffer oder auch durch Erwärmen von Neutralsalzlösungen. In saurer Lösung sind die Karboxylgruppen des Kollagens undissoziiert, die elektrostatischen Abstoßungskräfte zwischen den positiven Gruppen der Ammonium- und Guanidiniumionen halten die Moleküle in Lösung. Während der Dialyse steigt der pH-Wert an, die Carboxylgruppen dissoziieren und die neugebildeten negativen Ladungen reagieren mit den positiven Ladungen anderer Kollagenmoleküle, es kommt zu einer geordneten Aggregation der Moleküle.

Bei Neutralsalzlösungen werden die Ladungen in der Kälte durch die vorhandenen Ionen abgeschirmt, sodaß die Moleküle gelöst bleiben. Erst beim Erwärmen auf 30° bis 36°C bilden sich die Fibrillen. Sie können durch Abkühlen oder -bei gleicher Temperatur- durch Erhöhung der Ionenstärke teilweise wieder in Lösung gehen.

Alle diese Prozesse sind besonders zu bedenken, wenn die Radioaktivität des Überstandes richtig als Indiz für eine Kollagenaseaktivität gewertet werden soll. Auf die Konstanz der Ionenstärke, der Temperatur und des pH-Wertes ist deshalb genau zu achten.

Bevor die abgekippten Medien auf ihre kollagenolytische Aktivität viskosimetrisch oder im radioaktiven Geltest untersucht wurden, wurden sie einer Druckdialyse unterzogen (Versuch 9). Dazu wird die Flüssigkeit in eine zylinderförmige Zelle eingebracht, deren Bodenfläche von einer Membran wohldefinierter Porengröße gebildet wird (Amicon). Bei einem angelegtem Druck von 5-6 At (Stickstoff) werden die Moleküle, die unterhalb der Durchlaßgrenze von 20.000 liegen, durch die Membran gepreßt (=Druckdialysat). Ein zentriertes Rührwerk verhindert die Verstopfung der Poren durch höhermolekulare Substanzen. Mit dieser Vorrichtung wurde das Volumen der Medien um 80 % verringert.

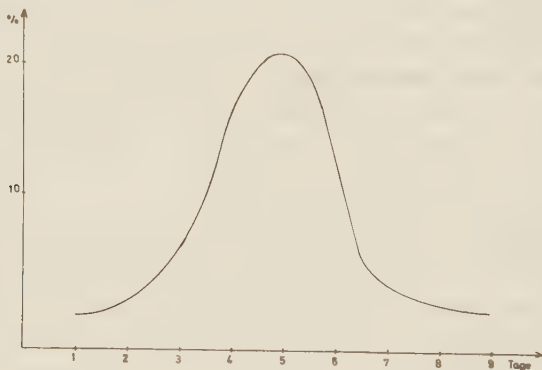


Abb. 10: Kollagenasebestimmung mit rad.Kollagen.
Absz.:Zeit in Tagen;Ord.:Prozentuale Zunahme der Radioaktivität im Überstand nach 6 Stunden Inkubation

In der obigen Abbildung sind die ermittelten kollagenolytischen Aktivitäten graphisch dargestellt. Im Unterschied zu der sehr ähnlich verlaufenden Hydroxyprolinkurve wird hier die maximale Aktivität bereits am fünften Tag erreicht. Die zeitliche Vorverlegung beruht darauf, daß bei diesem Versuch der erste Mediumwechsel nicht nach 24 Stunden, sondern bereits nach 12 Stunden vorgenommen wurde.

1.6. Viskosimetrie

Enzymatische Abbauvorgänge am nativen Kollagen können nach Gross und Nagai (117) viskosimetrisch verfolgt werden. Diese in der Enzymologie einzigartige Bestimmungsmethode basiert auf der hohen Strukturviskosität von Kollagenlösungen, die Ausdruck des extremen Achsenverhältnisses des Kollagenmoleküls (200:1) ist. Wird diese Proportion durch Enzymeinwirkung verändert, so sinkt die Viskosität ab, die Durchlaufzeit des Inkubationsgemisches sinkt ab.

Das Enzymsubstrat wurde nach einer von Engel modifizierten Vorschrift von Gallop hergestellt. Die säurelösliche Kollagenfraktion der Kalbshaut wurde mit Citratpuffer extrahiert, mehrfach über Fibrillen gereinigt und nach ausgiebiger Dialyse gegen 0,1 % Essigsäure bei 4°C aufbewahrt.

Diese Kollagenlösung ergab zusammen mit der Puffer- und Enzymlösung den Versuchsansatz. Die Inkubationstemperatur betrug 20°C. Schwankungen von einem halben Grad machen die Meßwerte unbrauchbar. Deshalb wurde bei jeder Viskositätsmessung die Temperaturkonstanz genau beachtet. Die Temperatur von 20°C ist für enzymatische

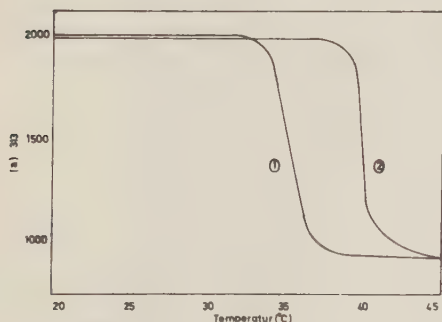


Abb.11: Denaturierungskurve von Kollagen. Absz.: Temperatur; Ord.: Drehwinkel;

1. Kollagen + Enzym

2. Kollagen + hitzeinaktiviertes Enzym

Material: gereinigtes Kalbshautkollagen in 0,05 % Acetat-Puffer, pH = 4,8; $\sqrt{2} = 0,15$

Untersuchungen recht ungewöhnlich. Im allgemeinen wird der physiologische Wert von 37°C bevorzugt, zumal bei erniedrigter Temperatur die Reaktionsgeschwindigkeit abnimmt. Eine Faustregel der Thermodynamik besagt, daß eine Temperatursteigerung von 10°C die Re-

aktion ungefähr um den Faktor 2 beschleunigt.

Die Notwendigkeit einer stark erniedrigten Temperatur ist aus Abb. 11 ersichtlich. Hier ist die optische Drehung einer Kollagenlösung in Abhängigkeit von der Temperatur dargestellt. Mit dem Übergang vom nativen zum denaturierten Zustand verringert sich der Drehwert in beträchtlichem Maße. Als Denaturierungstemperatur wird jener Wert definiert, der dem Mittel von minimaler und maximaler Drehung entspricht. Sie liegt für das Gemisch tadpole collagenase-Kollagen um 5°C niedriger als für eine enzymatisch nicht angegriffene Kollagenlösung. Bei 20°C sind also Denaturierungseffekte vollkommen ausgeschlossen, die strukturelle Integrität des Kollagenmoleküls ist gesichert.

Deuteten die viskosimetrischen Ergebnisse auf einen Kollagenabbau, so wurden die Reaktionsprodukte ausgefällt und mittels Diskelektrophorese aufgetrennt.

Die analytische Diskelektrophorese stellt eine der empfindlichsten Methoden zur Auftrennung komplexer Proteingemische dar. Sie erfordert im Vergleich zu Verfahren ähnlicher Leistungsfähigkeit nur einen sehr geringen Laboraufwand. Zwei physikalische Effekte sind für das hohe Auflösungsvermögen verantwortlich. Durch den Konzentrierungseffekt werden die Substanzen vor ihrer Trennung in einer sehr scharf begrenzten Zone zusammengedrängt. Diese Schärfung beruht auf Diskontinuitäten der Pufferpaare (Zusammensetzung, pH-Sprung) und auf unterschiedlicher Porengröße von Sammel- und

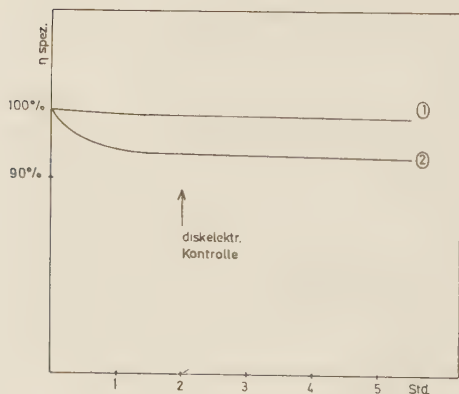


Abb. 12: Kontrollversuch mit Trypsin.

Absz.: Inkubationsdauer in Std.
Ord.: Prozentualer Viskositätsverlust einer Trypsin-Kollagenlösung;

1 = Temp. von 20°C

2 = Temp. von 30°C

Trenngel (118). Im Trenngel erfolgt die Trennung der einzelnen Moleküle nicht nur nach ihrer elektrischen Gesamtladung, sondern auch nach ihrem Molekulargewicht und ihrer Gestalt. Für diesen Molekularsiebeffekt (119) ist die durchschnittliche Porengröße des Gels entscheidend, die durch Änderung der Acrylamidkonzentration einstellbar ist und so den jeweiligen Anforderungen angepaßt werden kann. An Hand theoretischer Modelle konnte man zeigen, daß 7,5 % Polyacrylamidgele eine durchschnittliche Porenweite von 50 Å und 30 % Gele einen Porendurchmesser von etwa 20 Å aufweisen.



Abb. 13: Abbauversuch mit Trypsin. Links $t = 20^{\circ}\text{C}$; Rechts $t = 30^{\circ}\text{C}$;

In einem Vorversuch soll die Einwirkung von Trypsin (als Vertreter unspezifischer Proteasen) auf Kollagen (Enzym-Substratverhältnis 1:10) viskosimetrisch (Versuch 10) und diskelektrophoretisch (Versuch 11) genau untersucht werden. Zu den Messungen wurde ein Ubelohde-Viskosimeter (Cannon 100) verwendet mit einer Wasserdurchlaufzeit von 70 Sek. bei 20°C. Die spezifische Viskosität des Reaktionsgemisches wurde zum Zeitpunkt $t = 0$ gleich 100 % gesetzt und die im Verlauf der Inkubation zu beobachtende Viskositätsabnahme prozentual darauf bezogen. Der Abb. 12 zugrunde liegende Versuch zeigt einen deutlichen Viskositätsverlust von etwa 7 % erst bei einer Temperatur von 30°C, bei 20°C kann die Änderung vernachlässigt werden. Nach zwei Stunden wurde ein Aliquot der Lösung dem Viskosimeter entnommen, die Reaktion mit DFP (Diisopropylfluorophosphat) gestoppt und die Reaktionsprodukte diskelektrophoretisch untersucht.

Da Kollagen in seiner nativen Form als fibrilläres Protein (ebenso wie Fibrinogen) nicht in das Trenngel einwandert, wird es durch Harnstoff denaturiert. Entscheidend für diesen vorbereitenden Schritt ist die Tatsache, daß die Primärstruktur dabei völlig intakt bleibt. So zeigen sich auf dem Bild einer analytischen Disk-elektrophorese von Kollagen (Abb. 13) vor allem α -Banden, des weiteren β -Banden und ganz schwach γ -Banden. (Zur Definition dieser Banden siehe S. 8)

Die Analyse der Ansätze (Abb. 13), die bei 20°C inkubiert wurden, ergaben erwartungsgemäß ein negatives Ergebnis. Im Gegensatz dazu können bei der erhöhten Temperatur von 30°C deutliche Abbauvorgänge am Kollagen beobachtet werden.

Nach diesem Vorversuch kann festgestellt werden: erstens können

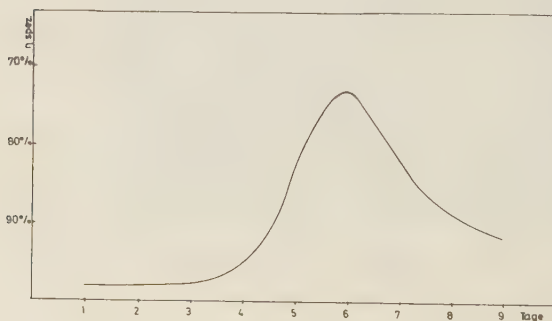


Abb. 14: Viskosimetrie.
Änderung von η_{spez} .
nach 2-stünd. Inkubation
von Medium und Kollagen;
Absz.: Zeit
Ord.: Prozentuale Abnahme von η_{spez} .
Inkubationstemp.: 20°C

unspezifische Proteasen bei 20°C am nativen Kollagen keine nennenswerte Aktivität entfalten, und zweitens sind bereits Änderungen von weniger als 10 % in der spezifischen Viskosität diskoelektrophoretisch erkennbar.

Welche kollagenolytischen Effekte lassen sich nun mit den Medien der kultivierten Haut im Viskosimeter feststellen?

Abb.14 zeigt die prozentuale Abnahme der spezifischen Viskosität zwei Stunden nach Vereinigung von Kollagen- und Enzymlösung. Von sehr niedrigen Anfangswerten steigt die Kurve steil an, erreicht am sechsten Tag ihr Maximum mit einer Viskositätsabnahme von 25 % und fällt danach wieder ab.

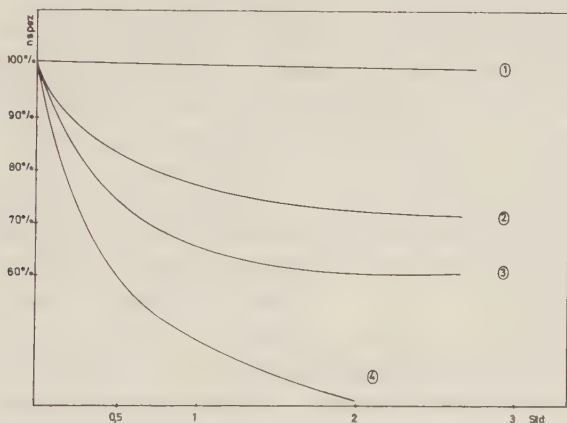


Abb.15: Einwirkung verschiedener kollag. Enzyme auf Kollagen. Absz.: Inkubationsdauer in Std.; Ord.: Prozent. Abnahme der spez. Viskosität; Temperatur 20°C;

- 1) Kontrolle ohne Enzym, 2) Abgek. Medium der Mäusehaut, 3) tadpole-Kollagenase, 4) Clostridiopeptidase A (Temp. = 27°C)

Werden in kurzen Abständen die Durchlaufzeiten gemessen, so kann man den zeitlichen Verlauf der enzymatischen Reaktion sehr schön verfolgen. Abb.15 (2) zeigt die Einwirkung des fünften abgekippten Mediums auf natives Kollagen. Die Kurve ist gekennzeichnet durch die sehr hohe Viskositätsänderung bei Reaktionsbeginn, die nach kurzer Zeit rasch abnimmt. Nach drei Stunden verläuft die Kurve abszissenparallel, die Reaktion ist beendet.

Da bei dieser Methode die enzymatische Aktivität als relative Größe ($n_{\text{spez.}}$) ausgedrückt wird, kann ein Vergleich mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen sinnvoll durchgeführt werden. Die Kurve 3 der Abb. 15 zeigt den prozentualen Viskositätsverlust wie er von Gross und Nagai (117) bei sehr ähnlichen Versuchsbedingungen (Temperatur 20°C , Puffer: Tris-HCl, NaCl, statt CaAc_2 wurde CaCl_2 verwendet, $\text{pH} = 7,5$) mit der tadpole-Kollagenase ermittelt wurde. Die beiden Kurven 2 und 3 zeigen denselben charakteristischen Verlauf. Das Ende der Reaktion wird jedoch auf unterschiedlicher Höhe erreicht. Während die tadpole-Kollagenase zu einer Viskositätsänderung um 40 % führt, reduziert das Enzym der Mäusehaut nur um 25 %. Diese Diskrepanz beruht auf dem unterschiedlichen Reinheitsgrad der Enzympräparationen. Während das abgekippte Medium der Mäusehautkultur lediglich fünffach konzentriert war, wurde die tadpole-Kollagenase durch fraktionierte Ammonsulfatfällung, Gel-filtration an Sephadex, Stärkegelelektrophorese und DEAE-Cellulose-Chromatographie um den Faktor 300 gereinigt.

Völlig anders stellt sich die Einwirkung der Clostridiopeptidase auf natives Kollagen viskosimetrisch dar. Dieser Versuch wurde von der Arbeitsgruppe um Evanson (120) durchgeführt. Die erhöhte Inkubationstemperatur von 27°C war hierbei der einzige bemerkenswerte Unterschied zu den bisher angewandten Versuchsbedingungen. Für die Bewertung des Versuchsergebnisses ist diese Tatsache unerheblich, bei niedrigerer Temperatur würde sich die Kurve lediglich nach rechts verlagern. Wie man sieht, greift die Clostridiopeptidase A das Kollagen wesentlich schneller an (Kurve 4), nach 2 Stunden sinkt die spezifische Viskosität bereits auf 20 % des Ausgangswertes ab, der Abbau bleibt nicht auf einer bestimmten Stufe stehen, sondern schreitet bis zum völligen Viskositätsverlust weiter und erreicht nach 5 Stunden den Wert der Pufferlösung.

1.7. Analytische Diskelektrophorese

Die diskelektrophoretische Analyse des Inkubationsgemisches (Mäusehautmedium und Kollagen) zeigt zahlreiche Banden als Ergebnis des abgelaufenen Spaltungsprozesses (Abb. 16). Die Kollagenbruchstücke besitzen ein sehr hohes Molekulargewicht. Es ist überaus

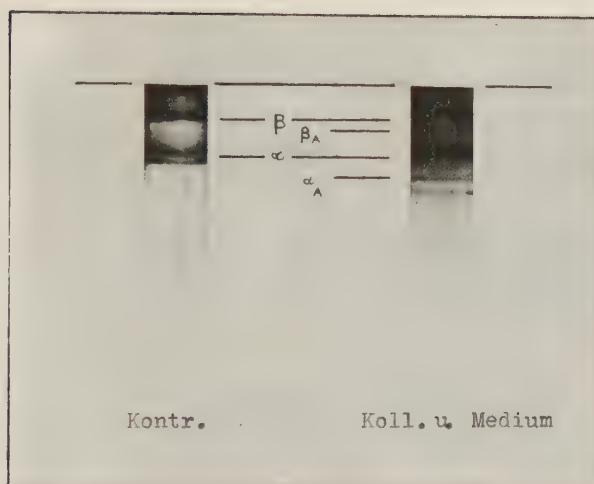


Abb.16: Diskelektroph. von enzymatisch entstandenen Kollagenfragmenten.

wahrscheinlich, daß einige Banden (wie in Abb.16 bezeichnet) den aus der Literatur bekannten Kollagenbruchstücken α^A und β^A entsprechen (beide sind identisch mit TC^A , dem $3/4$ Bruchstück des Kollagens).

1.7. Kombiniertes Trenn- und Nachweisverfahren

Das Ergebnis einer weiteren Methode, kollagenolytische Enzyme nachzuweisen, zeigt Abb.17. Bei diesem Versuch wurde zunächst eingeeignetes Medium (abgek. am 4.Tag) in einer analytischen Diskelektrophorese nach Davis und Ornstein aufgetrennt. Zur Dokumentation des Trennergebnisses wurde ein Gel mit Amidoschwarz angefärbt, die anderen in ein Glasröhrchen eingebracht, mit einer Kollagenlösung umgossen und zur Ausbildung eines Kollagengels bei $37^\circ C$ im Brutschrank inkubiert. Nach 5-6 Stunden war das Elektrophoresegel von einem mantel fibrillären Kollagens gleichmäßig umgeben. Sollte das im Nonmaterial vorhandene kollagenolytische Enzym die Elektrophorese unbeschadet überstanden haben und war es von den zahlreichen Ionen (siehe Pufferzusammensetzung und Gellösungen Versuch 11) nicht völlig inaktiviert worden, so konnte es in das umgebende Kollagengel diffundieren und dieses auflösen. Dieser erwartete Effekt trat tatsächlich ein. Er war nach 12 Std. noch nicht sichtbar, nach 24 Stunden jedoch voll ausgeprägt. Der Test

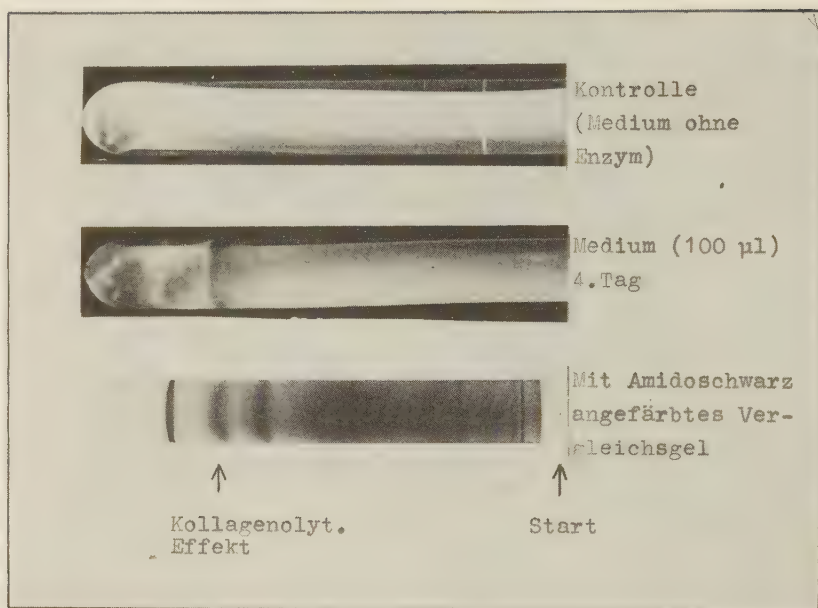


Abb.17: Kombiniertes Trenn- und Nachweisverfahren.

zeigt eine quantitative Abhängigkeit. Bei 10, 20, 30 µl aufgetragenem Medium konnte keine Lyse, wohl aber bei 50 und 100 µl beobachtet werden. Diese Methode ist zur qualitativen Analyse geeignet und erlaubt den Nachweis kleinster Enzymmengen.

1.9. Testung auf unspezifische Proteolyse

Die bisher durchgeführten Trypsinkontrollen bei dem radioaktiven Kollagenasetest und der viskosimetrischen Methode lassen mit Sicherheit ausschließen, daß die beobachteten Abbauvorgänge am Kollagen durch ein derartiges Enzym bewirkt worden sei. Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, daß Trypsin ein Ferment der Bauchspeicheldrüse darstellt und zusammen mit Pepsin die Aufgabe besitzt, hochmolekulare Eiweißstoffe zu resorptionsfähigen Peptiden abzubauen. Dies ist das einzige Vorkommen und die einzige physiologische Bedeutung dieses Enzyms. Es wird in die Gruppe der endopeptidasen eingeordnet und spaltet ausschließlich Lysyl- und Ar-

ginylblindungen. Auf Grund der fehlenden Substratspezifität, der leichten Verfügbarkeit und eines pH-Optimums zwischen 7,5 - 8,5 wurde Trypsin das wichtigste Enzym, um die Resistenz von Kollagenpräparationen gegenüber unspezifischen Proteasen zu eruieren. Könnte aber nicht ein Gemisch intrazellulärer Peptidasen und Proteasen im kombinierten Angriff die deutlichen Zerstörungsvorgänge am Kollagenmolekül bewirkt haben? Sollte ein solches Enzymsystem tatsächlich existieren, so müßte es

1. in den ersten Tagen der Kultivierung die höchste Aktivität entfalten und
2. auf Grund der fehlenden Substratspezifität auch andere Proteine verdauen.

Die erste Annahme wird dadurch widerlegt, daß die Medien der ersten beiden Tage nur sehr geringe kollagenolytische Effekte aufweisen. Zur Klärung der zweiten These wurde das konzentrierte Medium eines jeden Tages auf die Möglichkeit, Casein zu spalten, untersucht (Versuch 12). Bei dieser von Kunitz (121) beschriebenen Methode wird die Enzym-Caseinlösung bei Reaktionsende mit TCA gefällt, zentrifugiert und die Extinktion des Supernatans bei 280 m μ gemessen. Dieser Wert stellt ein Maß für die Enzymaktivität dar. Obwohl dieser Test mehrfach mit den Medien durchgeführt wurde, konnte bei pH = 7,2 nie eine caseinolytische Aktivität entdeckt werden. Zu den gleichen negativen Ergebnissen kamen auch andere Arbeitsgruppen.

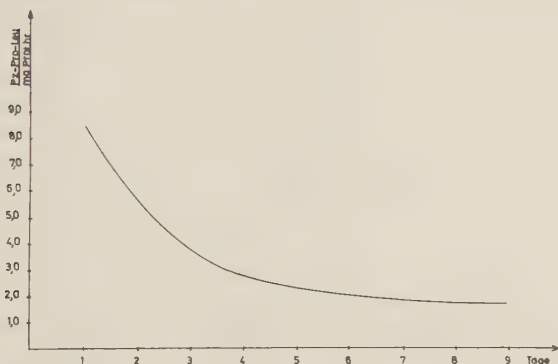


Abb. 18: Spaltung des Pz-Penta-Peptids im Verlauf der Kultiv.
Absz.: Zeit in Tagen
Ord.: spez. Aktivität

1.10. Testung mit dem künstlichen Substrat Pz-Penta-Peptid

Als vierte Nachweismethode für kollagenolytische Enzyme kommen künstliche Modellpeptide des Typus $(\text{Gly-Pro-X})_n$ als Testsubstrat zur Anwendung. Sie wurden den Spezifitätsanforderungen der Clostridiopeptidase A entsprechend synthetisiert. Um die Wertigkeit der Spaltung nativen Kollagens und künstlichen Substrats nicht vor-eilig einander gleichzusetzen, sollen die das Modellpeptid spal-tenden Enzyme als Peptidasen bezeichnet werden. Das von Wunsch u. Heidrich (122) dargestellte Chromophorsubstrat Pz-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg (Pz = 4-phenylazobenzyloxycarbonyl-) ermöglicht eine sehr schnelle und einfache quantitative Bestimmung. Das Peptidbruch-stück Pz-Pro-Leu wird nach Ansäuern wasserunlöslich und kann in eine organische Phase ausgeschüttelt werden. Darin läßt sich die chromophore Gruppe Pz colorimetrisch nachweisen (Versuch 13). Abb. 18 zeigt die Spaltungsraten (freigesetztes Substratbruchstück/ Zeit bezogen auf die Proteinmenge), die mit den täglich abgekip-pen, nicht eingeeengten Medien ermittelt wurden. Die Aktivitäten

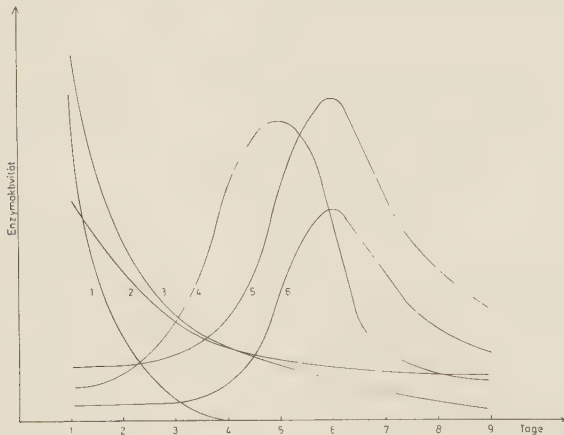


Abb. 19: Zusammenfassung der verschiedenen Bestimmungen im Verlauf der Gewebekultur.

- 1 s. Phosphatase; 2 Pz-Penta-Peptidspalt.
- 3 Proteinkurve; 4 rad. Kollagenasetest
- 5 Hydroxyprolinbest. 6 Viskosimetrie

fallen von sehr hohen Werten der ersten beiden Tage rasch ab und erinnern in ihrem Verlauf an die Kurve der Proteinkonzentration. Um einen Vergleich der bisher einzeln aufgeführten Versuchsergebnisse anstellen zu können, sind die wichtigsten Kurven in Abb. 19 zusammengestellt.

Wie man sieht, können die sechs Kurven in zwei Gruppen eingeteilt werden. Während die erste durch sehr hohe Anfangswerte und nachfolgendem abfallenden Verlauf (Proteinkurve, saure Phosphatase, Pz-Penta-Peptid-Spaltung) gekennzeichnet ist, wird die zweite Gruppe durch ein eindeutiges Maximum am 6. Tag charakterisiert. Dieser liegen die Versuchsergebnisse zugrunde, die unter Anwendung nativen Kollagens als Testsubstrat gewonnen wurden. Die Bestimmungen der Peptidase und des kollagenolytischen Enzyms führten also in dieser Versuchsreihe zu völlig verschiedenen Ergebnissen. Gerade zu der Zeit, da die Peptidspaltung auf sehr niedrige Werte abgefallen ist, können signifikante Abbauerfolge am natürlichen Substrat verzeichnet werden. Diese Befunde drängen zu der Vermutung, daß mit den angebotenen Substraten nicht zwei identische Enzyme erfaßt wurden. Die weitere Frage, ob die geringe Kollagenolyse am ersten Tag der Nebeneffekt einer Peptidase ist und umgekehrt die Peptidspaltung um den fünften Versuchstag mit einem kollagenolytischen Enzym zusammenhängt, kann zu diesem Stadium der Arbeit noch nicht beantwortet werden. Dieses Problem soll durch Experimente gelöst werden, die die Fähigkeit gereinigter Enzympräparationen untersuchen, das Modellpeptid wie das natürliche Substrat zu spalten.

2. Anreicherung des kollagenolytischen Enzyms

2.1. Gelfiltration mit Bio-Gel

Eine der besten Methoden zur präparativen Auftrennung von Proteingemischen stellt die Gelfiltration dar. Dazu wird in ein zylindrisches Rohr ein Material eingefüllt, das auf Grund seiner Raumstruktur und seines Vernetzungsgrades ein molekulares Maschenwerk bildet. Wird nun ein Substanzgemisch auf die Gelsäule aufgetragen, so wandern die kleinen Moleküle in die Maschen ein und werden dadurch den größeren Komponenten gegenüber mit Verzögerung eliminiert. Wesentlich ist, daß Molekulargewichte der zu trennenden Moleküle und Trenngel aufeinander abgestimmt sind. Durch die moderne Verfahrenstechnik gelang es Gele herzustellen, die den Arbeitsbereich dieser Methode von der Trennung anorganischer Salze bis zu hochmolekularen Partikeln wie Viren und Bakteriophagen ausweiten. Bei der Bewertung des Trennergebnisses muß man berücksichtigen, daß der Molekularsiebeffekt in unterschiedlichen Maße von anderen Faktoren begleitet wird. So kann die Adsorption von Substanzen an das Gelmaterial die auf Grund theoretischer Überlegungen erwarteten Ergebnisse erheblich beeinträchtigen. Darauf wird

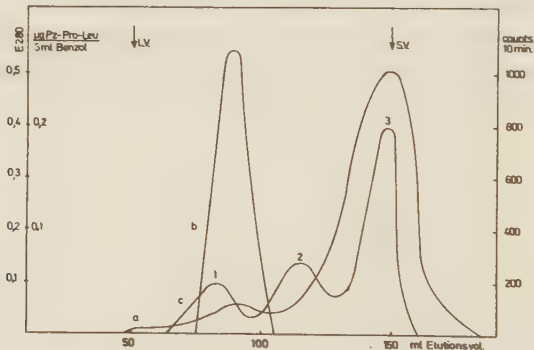


Abb.20: Gelfiltration mit Bio-Gel A 1,5 (2,5× 30 cm);
 Auftrennung des Mediums 5.und 6. Tag;
 Elutionspuffer: 0,05 m Tris-HCl, 0,005 m CaAc₂, pH = 7,5
 Durchflußgeschw.: 15 ml/hr
 Abk.: L.V. = Leervolumen, S.V. = Salzvolumen

Fortsetzung der Legende Abb.20: a) Proteinkurve E 280

b) Spaltung des Pz-Penta-Peptids

c) Spaltung des rad. Kollagens

bei der Entsalzung nochmals verwiesen.

Das verwendete Bio-Gel A 1,5 mit 200-400 mesh (Versuch 14) ist ein Agarosegel mit einem Arbeitshereich von 10.000 - 1.000.000. Zur Bestimmung des Salzvolumens (Menge an Puffervolumen, bei dem die kleinen Ionen im Eluat erscheinen) wurde ein Probelauf mit Kaliumcyanid durchgeführt (Versuch 15), das Leervolumen (Elutionsvolumen für nicht einwandernde Moleküle) wurde in einem Vorversuch mit Dextranblau 2000 ermittelt.

Als Maßstab für die Proteinkonzentration der Fraktionen diente die Extinktion bei 280 mμ (Versuch 16). Die Spaltung des künstlichen Peptids wurde im gleichen Testansatz bestimmt, wie er sich bereits bei den Versuchen mit den Kulturmedien bewährt hatte. Zur Erfassung der Spaltung des natürlichen Substrates diente der Abbauversuch mit radioaktiven Kollagen.

Wie aus dem Überblick der Seite 42 (Abb.19) zu erkennen ist, stellen die Medien der ersten beiden Tage das günstigste Ausgangsmaterial zur Anreicherung der Peptidase dar, während sich die Medien des 5. und 6. Tages zur Reinigung kollagenolytischer Enzyme besonders eignen.

Bei der ersten Auftrennung wurde ein Gel mit einem sehr hohen Arbeitsbereich gewählt, da die Molekülgröße der fraglichen Enzyme völlig unbekannt war.

Als Ausgangsmaterial wurden die Medien des 5. und 6. Tages gesammelt, mit der Diaflow-Apparatur (Amicon) auf das 20-fache konzentriert und auf die Gelsäule aufgetragen. Abb.20 zeigt die Verteilung der Proteine und Enzymaktivitäten in den Fraktionen. Die Proteinkurve verläuft in einem weiten Bereich bei sehr niedrigen Werten, zeigt aber am Ende des Elutionsvorganges ein ausgeprägtes Maximum. An dieser Stelle erscheinen im Eluat die gesamten Salze und niedermolekularen Substanzen des Mediums, die bei sehr hoher Konzentration eine durch Protein bedingte Extinktion vortäuschen können.

Der Salzpeak umschließt ein Maximum der Spaltung radioaktiven

Kollagens. Hier sei auf den beschriebenen Mechanismus der Fibrillenbildung in vitro zurückverwiesen (S.31), der die Ablösung fibrillären Kollagens aus dem Gelverband unter dem Einfluß hoher Salzkonzentrationen verständlich macht. Der dritte Gipfel kollagenolytischer Aktivität ist demnach als Artefakt zu erklären. Der mittlere Peak (2) mit einem Maximum bei 115 ml zeigt eine Enzymaktivität von 300 counts/10 min.. Das hier aktive Enzym dürfte nach einer Eichkurve für Bio-Gel A 1,5 (BioRad Prospekt) ein ungefähres Molekulargewicht von 20.000 besitzen.

Der etwas niedrigere Peak 1 kann auf zwei Arten interpretiert werden. Dem Maximum kann ein zweites kollagenolytisches Enzym zugrunde liegen, das ein höheres Molekulargewicht aufweist, aber etwas langsamer spaltet. Es könnte aber auch ein Nebeneffekt der an dieser Stelle hochaktiven Peptidase sein.

Die Messungen der Pz-Penta-Peptidspaltung ergaben ein sehr scharfes Maximum bei einer Eluatmenge von 90 ml. Dies entspricht einem Molekulargewicht von etwa 160.000. Die enzymatisch aktivste Fraktion spaltet $100 \mu\text{g} \frac{\text{Pz-Pro-Leu}}{\text{mg Prot.} \cdot \text{hr}}$.

2.2. Kurze Charakterisierung

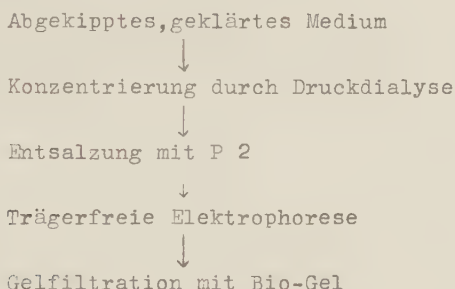
Mit den Fraktionen dieser Chromatographie wurde noch ein weiterer Versuch angestellt, der über die Art des enzymatischen Kollagenabbaues Aufschluß geben sollte. Dazu wurde im ersten Schritt 1 ml jeder Fraktion mit Kollagen entsprechend dem Viskosimetrieansatz zusammengegeben und für acht Stunden bei 20°C inkubiert. Im zweiten Schritt wurde dieses Enzym-Kollagengemisch mit Kochsalz (20 % Endkonzentration) gefällt, um die hochmolekularen Bestandteile durch hochtourige Zentrifugation entfernen zu können. Im dritten Schritt wurde der Überstand auf freigesetzte α -Aminosäuren mit dem Ninhydrinreagenz untersucht. Diese Bestimmung brachte für sämtliche Proben ein negatives Ergebnis, was unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus dem radioaktiven Kollagenasetest darauf schließen läßt, daß keine nachweisbaren Mengen von α -Aminosäuren bei der Reaktion entstehen, sondern vorwiegend hochmolekulare Fragmente.

Die wesentlichsten Ergebnisse des ersten Trennversuches stellen

die Verteilungskurven des kollagenspaltenden Enzyms und der Pz-Penta-Peptid spaltenden Peptidase dar. Zur weiteren Klärung der Frage, ob Peak 1 der Kollagenaseaktivität ein Nebeneffekt der Peptidase ist, wurde dieses Enzym isoliert.

3. Isolierung des Peptid spaltenden Enzyms

Das nachfolgende Schema soll einen Überblick über die einzelnen Reinigungsschritte geben:



Um nach den einzelnen Arbeitsgängen eine möglichst hohe Aktivitätsausbeute zu erzielen, soll die Reinigung in einer laufenden Aufarbeitung ohne Einfrieren und Auftauen, ebenso ohne Gefrier-trocknen der Lösungen durchgeführt werden.

3.1. Vorbereitung des Rohmaterials

Wie aus Abb. 19 ersichtlich, lassen sich die abgekippten Medien der ersten beiden Tage am besten als Ausgangsmaterial für die Anreicherung der Peptidase verwenden. Nach einer Klärung der Medien durch 3 μ Filtration (Sartorius-Membranfilter) wurde das Volumen durch Druckdialyse auf ein Zehntel verringert. Dieses Konzentrat wurde durch Gelfiltration mit Bio-Gel P 2 von den niedermolekularen Begleitstoffen befreit und die Fraktionen mit dem hochmolekularen Anteil eingengt (Versuch 17). Diese Beseitigung der Salze stellt eine wichtige Voraussetzung zur optimalen Auftrennung des Rohmaterials in der trägerfreien Elektrophorese dar. Die zu Beginn

der Trennversuche praktizierte Methode der Dialyse gegen Kammerpuffer konnte diesen Zweck nur mit sehr hohen Proteinverlusten erfüllen. Die Entsalzung an der Gelsäule verläuft schonender und schneller, obgleich sie mit einem höherem Arbeitsaufwand verbunden ist. (123)

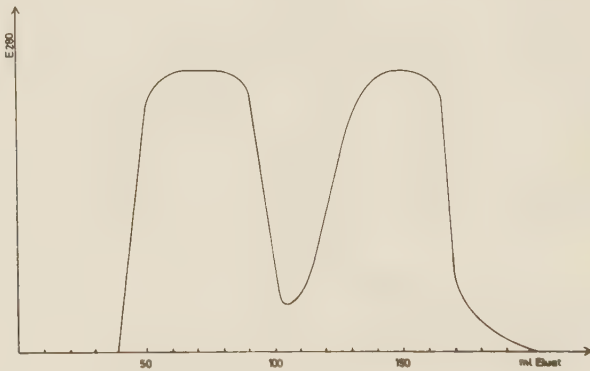


Abb.21: Entsalzung mit Bio-Gel P 2, Medien des 1. und 2. Inkubationstages; Absz.: Elutionsvol. Ord.: Ext. bei 280

3.2. Trägerfreie Elektrophorese

Die Fraktionen des Proteinpeaks wurden durch Druckdialyse (Amicon) eingeengt und die Konzentrate mittels der kontinuierlichen, trägerfreien Elektrophorese nach Hannig (124,125) aufgetrennt (Versuch 18). Dieses Verfahren hatte sich bereits bei der Reinigung der Clostridiopeptidase A bewährt.

Im Prinzip strömt quer zu den Kraftlinien eines elektrischen Feldes eine Pufferlösung, der das zu trennende Gemisch kontinuierlich zugeführt wird. Der unterschiedlichen elektrophoretischen Beweglichkeit nach werden die Komponenten entsprechend abgelenkt und können nach Verlassen der Apparatur an verschiedenen Stellen entnommen werden. Das Verfahren ist zur raschen Auftrennung größerer Proteinmengen hervorragend geeignet, was für den ersten Schritt einer Enzymreinigung sehr nützlich ist.

Die elektrophoretische Auftrennung wurde mit verschiedenen Puffer-

salzen, Ionenstärken und pH-Werten versucht. Eine sehr gute Trennung konnte bei pH = 8,0 und einem Kammerpuffer (0,0125 m Tris-HCl; 0,00125 m CaAc_2) von 800 μS Leitfähigkeit erreicht werden. Die anfangs aufgetretenen Aktivitätseinbußen wurden durch Vorlage von Calciumacetat (Endkonzentration = 0,001 m) beseitigt. Zur Vermeidung von Lagerungsverlusten während mehrstündiger Trennung wurde sowohl das Proteingemisch wie auch die Fraktionen im Eisbad gekühlt. Das Diagramm (Abb. 22) der Absorptionsmessung bei 280 m μ zeigt eine weite gleichmäßige Verteilung der Proteine über das ganze elektrische Feld. In Fraktion 44 fand man bei allen Trennungen die höchste Enzymaktivität. Im Durchschnitt wurde eine fünf-fache Anreicherung erzielt.

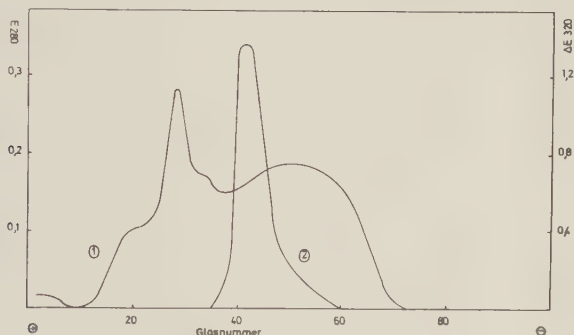


Abb. 22: Trennung der Medien (1.- 3. Tag) durch trägerfreie, kont. Elpho.

Elektrodenpuffer: 0,1 m Tris-HCl, 0,01 m CaAc_2 , pH = 8,0
 $k = 0,0055 \text{ s}$;

Kammerpuffer: 0,0125 m Tris-HCl, 0,00125 m CaAc_2 , pH = 8,0
 $k = 0,00080 \text{ s}$;

Spannung $U = 1000 \text{ V}$; Stromstärke $I = 100 \text{ mA}$; Temp. $7^\circ - 8^\circ$;
 Dosiergeschw. 3,5 ml/hr; Absauggeschw. 185 ml/hr;

1) Proteinverteilung 2) Spaltung von Pz-Penta-Peptid.

3.4. Gelfiltration (126)

Die vorgereinigte Peptidase wurde in einem zweiten Schritt einer Gelfiltration unterzogen. Dazu wurde ein Agarosegel (Bio-Gel A 0,5, 200 - 400 mesh; Fi. Bio Rad) verwendet, das in einem Bereich von 10.000 - 500.000 die Moleküle nach ihrer Größe auftrennt. Im reverse flow, bei relativ geringer Beladung und langsamen Durchfluß konnte eine hervorragende Trennung erreicht werden (Abb.24, S. 50).

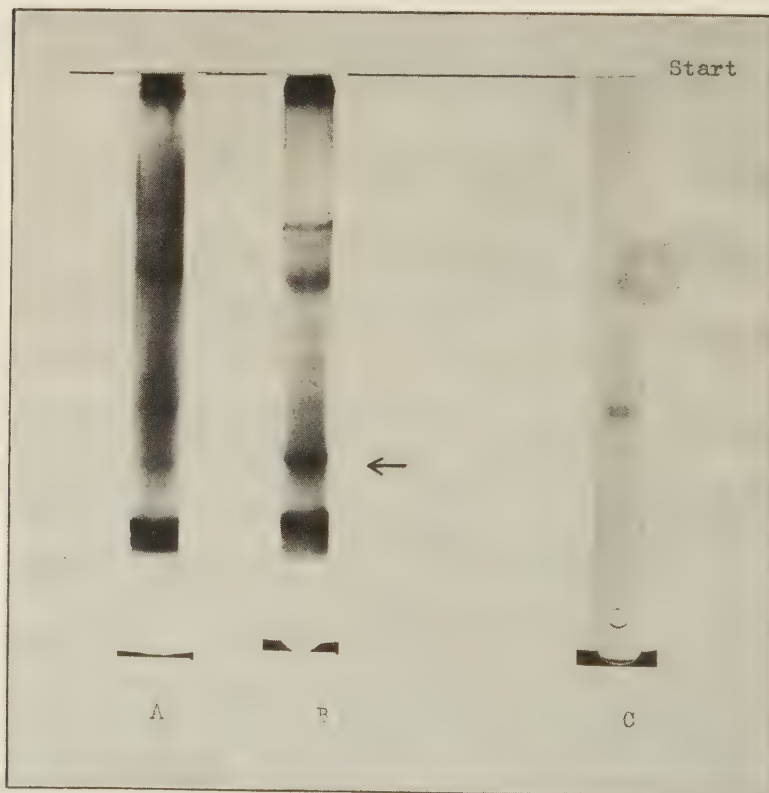


Abb.23: Diskelek. Reinheitskontr. der Peptidase
(Erläuterung im Text)

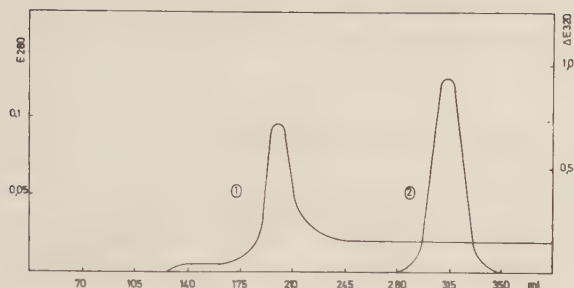


Abb.24: Gelfiltration mit Bio-Gel A 0,5 (Versuch 19).
 Säulenabmessungen 2,5 100 cm; reverse flow;
 Elutionspuffer: 0,05 m Tris-HCl, 0,005 m CaAc₂, pH = 8,0;
 Pufferzulauf 14 ml/hr, Fraktion zu 7 ml;
 1) Proteinkurve, 2) Pz-Penta-Peptid Spaltung

3.4. Reinheitskont. mit anal. Diskelpho.

Mit der analytischen Diskelektrophorese wurden die einzelnen Trennungsschritte beobachtet. Das linke Bild (A) der Abb.23 zeigt die zahlreichen Banden des Proteingemisches, das in der trägerfreien Elektrophorese zur Auftrennung kam. Auf dem mittleren Bild (B) sieht man deutlich, daß eine rasch wandernde Bande (Pfeil) stark angereichert wurde. Die dritte (C) nicht im gleichen Disklauf angefertigte Analyse zeigt das isolierte Enzym nach der Gelfiltration.

Bei der geringen Anzahl der Trennschritte ist man über die hervorragende Reinigung einigermaßen erstaunt. Das gute Ergebnis dürfte auf mehrere Faktoren zurückzuführen sein:

Das Ausgangsmaterial bildete nicht ein Homogenat eines Gewebes, sondern Medien von kurzzeitig kultiviertem Gewebe der Haut (1. und 2. Tag), die vergleichbar einer Extraktion eine bedeutend geringere Proteinskala aufweisen. Die Entsalzung mit Polyacrylamidgel konnte vollständig die niedermolekularen Begleitstoffe von den höhermolekularen Proteinen abtrennen und zugleich schonend in den Puffer der Elektrophorese überführen. Im zweiten Trennungsschritt war

die elektrophoretische Beweglichkeit das einzige Trennungskriterium, während im letzten Schritt die Moleküle der Größe nach sortiert wurden.

Tabelle: Reinigung der Pz-Penta-Peptidase der Mäusehaut

Reinigungsschritt	Volu. ml	Protein mg	Ges.Aktiv.	spez.Akt. $\frac{\text{Pz-Pr-Leu}}{\text{mg Prot.hr}}$	Anreich. pro Stufe
Ausgangsmaterial	250	2100	14500	6,9	1
Einengung	50	2080	14300	6,85	1
Entsalzung	50	400	14000	35	5
Trägerfr. Elpho.		75	11800	157	4,5
Gelfiltration		0,42	3350	8000	51

4. Charakterisierung der Peptidase

Nach mehreren Aufarbeitungen war es möglich, genügend Material für

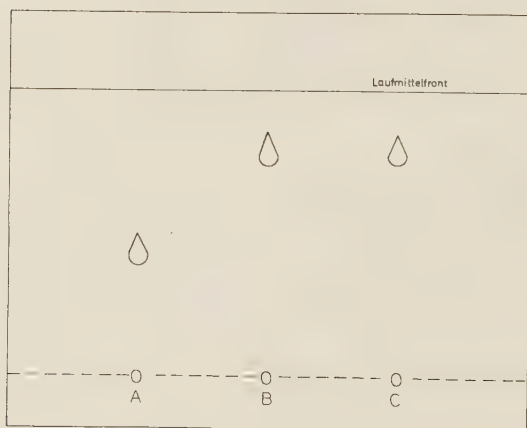


Abb. 25: Dünnschichtchromatographie des Substratbruchstücks.

- A) Pz-Penta-Peptid
- B) Vergleichssubstanz
Pz-Pro-Leu
- C) Probe

Experimente über die chemisch-physikalischen Eigenschaften des neu isolierten Enzyms bereitzustellen.

4.1. Dünnschichtchromatographie

Das Substrat mit der Aminosäuresequenz Pz-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg besitzt mehrere Bindungen, die durch Peptidasen hydrolytisch spaltbar sind. Die Dünnschichtchromatographie (Versuch 20) des Substratbruchstückes zeigt dieselbe Laufstrecke (Abb. 25) wie die Vergleichssubstanz Pz-Pro-Leu. Somit spaltet dieses Enzym die Leu - Gly Bindung und entspricht in seinem Substratangriff der Clostridiopeptidase A und anderen bakteriellen Kollagenasen.

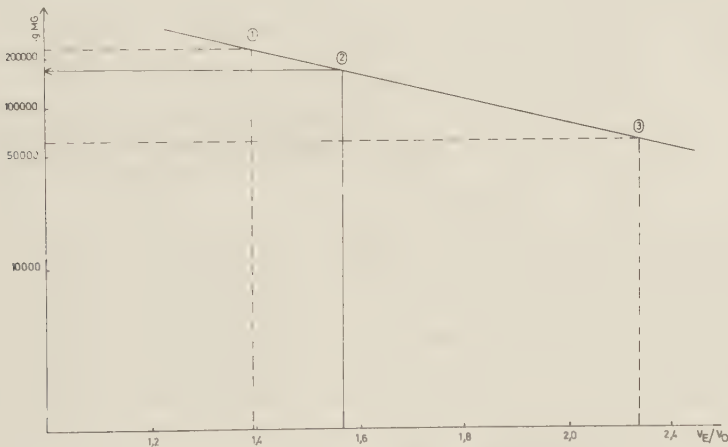


Abb. 26: Molekulargewichtsbestimmung mit Bio-Gel A 0,5.

Absz.: $\frac{V(E)}{V(O)}$; Ord.: Log. der Molekulargewichte

1) Katalase 2) Pz-Peptidase 3) Rinderserumalbumin

4.2. Molekulargewichtsbestimmung

Neben vielen anderen Faktoren stellt die Molekülgröße das wichtigste Kriterium bei vielen Trennverfahren dar. Diese Tatsache läßt sich zur Bestimmung des Molekulargewichtes mit der Gelfiltration verwerten. Diese Methode ist äußerst einfach durchzuführen, sehr materialsparend und bei einer Genauigkeit von $\pm 10\%$ recht aussagekräftig. Für Moleküle, die in die Polysaccharidstruk-

tur der Gelpartikel eindringen können, besteht dabei eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus ihres Molekulargewichtes und ihrem Elutionsvolumen V_E (K.A. Granath und P. Flodin 1961). Für die Bestimmung wurde die Bio-Gelsäule des letzten Reinigungsschrittes verwendet (Versuch 21). Das Leervolumen wurde mit Dextranblau 2000 bestimmt, Katalase (MG = 230.000) und Rinderserumalbumin (MG = 62.000) fixierten zwei Punkte der Eichkurve. Bei graphischer Auswertung der Kurve Abb. 26 ergibt sich ein Molekulargewicht von 180.000, das im Vergleich zu anderen Enzymen recht hoch liegt.

4.3. pH-Optimum

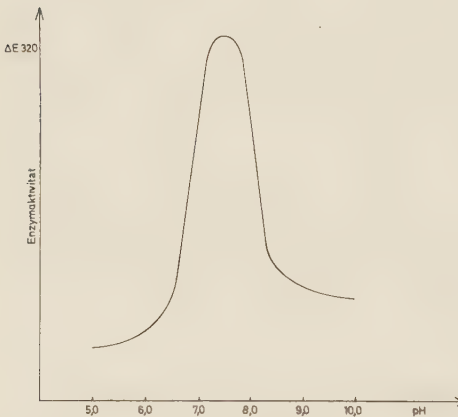


Abb. 27: pH-Abhängigkeit der Pz-Peptidase.

Biochemische Reaktionen laufen grundsätzlich unter dem Einfluß von Katalysatoren (Enzymen) ab. Verschiedene Faktoren können die Enzyme sowohl aktivieren als auch inhibieren. Für das Gleichgewicht in der Zelle wie im gesamten Organismus ist diese Regulation von entscheidender Bedeutung.

Zunächst wurde der Einfluß der Wasserstoffionenkonzentration auf die Reaktion untersucht (Versuch 22). Das pH-Optimum wurde im Bereich von 5,0-10,0 in einem Tris-Acetat-HCl Puffersystem bestimmt und ergab sich - wie aus Abb. 27 ersichtlich - mit einem scharfen Maximum bei pH = 7,5.

4.4. Michaelis-Menton-Konstante

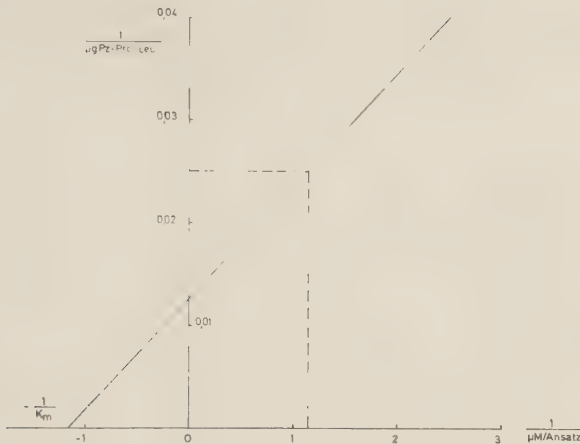


Abb.28: Graphische Ermittlung der Michaelis-Menton Konstante

Wählt man eine Versuchsanordnung, in der außer der Substratkonzentration alle anderen Bedingungen unverändert bleiben, so wird mit zunehmender Substratkonzentration die Reaktionsgeschwindigkeit ansteigen und schließlich ein Maximum erreichen, das auch bei weiterer Substratzugabe nicht überschritten wird (128). Diejenige Substratkonzentration, die der halbmaximalen Geschwindigkeit entspricht, nennt man Michaelis-Menton-Konstante und wird in Mol/ltr. angegeben. Sie stellt ein Maß für die Affinität eines Enzyms zu seinem Substrat dar. Niedrige Konstanten bedeuten hohe Affinität und umgekehrt. Das Verhalten der Enzyme in Abhängigkeit von der Substratkonzentration kann mit folgender Gleichung beschrieben werden:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot (S)}{K_m + (S)} ;$$

In diesem Ausdruck bedeuten: v = Reaktionsgeschwindigkeit
 $V_{\max}$ = Maximalgeschwindigkeit
 S = Substratkonzentration
 K_m = Michaeliskonstante

Diese Größen sind - ausgenommen K_m - alle leicht meßbar: die bei der jeweiligen Substratkonzentration gemessene Reaktionsgeschwindigkeit v und die bei Sättigung erreichte Geschwindigkeit $V_{\max}$. Die Auswertung gestaltet sich besonders einfach, wenn man die Gleichung umformt:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \times \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\max}} ;$$

Dies ist die Gleichung einer Geraden, wenn man $\frac{1}{v}$ und $\frac{1}{S}$ als Variable verwendet. Werden also die beiden Größen entsprechend aufgetragen, so kann aus den Schnittpunkten der Geraden mit der Achse leicht $V_{\max}$ bzw. K_m ermittelt werden. In Abb. 28 wurde K_m nach diesem Verfahren ermittelt. Da die Substratkonzentration in $\mu\text{Mol/Ansatz}$ (3,0 ml) angegeben ist, muß der graphisch ermittelte Wert umgerechnet werden. Demnach ergibt sich die Michaeliskonstante zu $2,7 \times 10^{-4}$ Mol/ltr. Die Konstanten anderer Enzyme bewegen sich in einem Bereich von 10^{-2} bis 10^{-6} Mol/ltr., wie aus nachfolgender Tabelle ersichtlich ist.

Tabelle 20. MICHAELIS-Konstanten einiger Enzyme

Enzym	Substrat	K_m
Succinat-Dehydrogenase	Succinat	[mol/l]
Arginase	Arginin	$1 \cdot 10^{-3}$
Pyrophosphatase		$5 \cdot 10^{-3}$
(Erythrozyten)	Pyrophosphat	$5 \cdot 10^{-4}$
Phosphopyruvat-Hydratase	2-Phosphoglycerat	$6 \cdot 10^{-5}$
Isocitrat-Dehydrogenase	Isocitrat	$3 \cdot 10^{-6}$

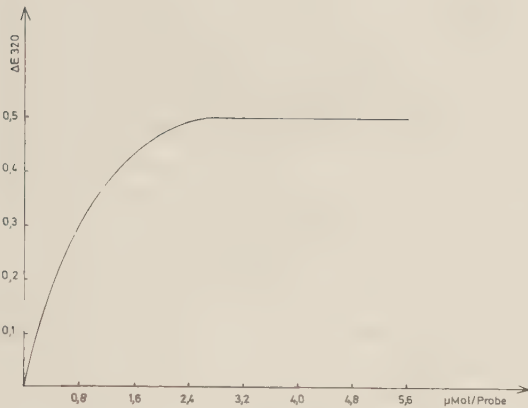


Abb.29: Ermittlung der Sättigungskonzentration.

Im gleichen Versuch kann auch bei anderer Auftragung die Sättigungskonzentration der Peptidase bestimmt werden. Dieser graphisch ermittelte Wert beträgt nach Umrechnung (wie bei K_m)

0,835 mMol/ltr. und ist deshalb von großer Bedeutung, da nur oberhalb dieses Wertes die gemessene Enzymaktivität ein Maß für die Menge an aktivem Enzym darstellt. Dieses Verhalten geht aus der

nächsten Abbildung hervor.



Abb.30: Abhängigkeit der Substratspaltung von der Enzymkonzentration.

Wird bei Sättigungskonzentration die Enzymreaktion in Abhängigkeit von der Menge des eingesetzten Enzyms gemessen, so ergibt sich eine direkte Proportionalität.

Die Gerade in Abb.30 be-

stätigt den ermittelten Sättigungswert für die Peptidase und zeigt, daß die eingesetzte Menge an Enzym der Extinktion direkt proportional ist. (Versuch 24)

4.5. Abhängigkeit von Calciumionen

Wie bereits erwähnt, können verschiedene Faktoren eine enzymatische Reaktion aktivieren oder inhibieren. Für Peptidasen, die die künstlichen Substrate Pz-Penta-Peptid und Cbo-Hexapeptid hydrolytisch spalten können, gibt es in der Literatur genaue Angaben über den Einfluß von Calciumionen auf die Reaktion. Die Peptidase der Mäusehaut wurde bei einem Enzym - Substratverhältnis von 1 : 10 parallel in einem Versuch mit und ohne Calciumionen getestet. Überraschenderweise wurde in beiden Fällen die gleiche Substratmenge umgesetzt. Die Calciumionen erhöhen also nicht die Aktivität des Enzyms. Die Tatsache aber, daß im Verlauf der Isolierung calciumfreie Präparationen einen schnelleren Wirkungsverlust zeigten, weist auf eine Bedeutung der Calciumionen für die Stabilität der Peptidase hin.

4.6. Einwirkung von Serumproteinen

Echte Kollagenasen werden durch Anwesenheit geringer Spuren Serums vollständig inhibiert. Der Einfluß von Mäuseserum auf die Peptidase wurde bei einer Konzentration von 0,01 und 0,001 untersucht. Das Ergebnis war eine 35 % Aktivitätssteigerung bei 1 % (Konzentration im Versuchsansatz) zugesetztem Serum.

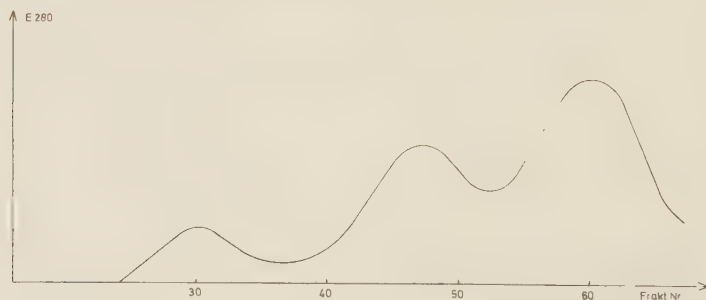


Abb.31: Auftrennung von Mäuseserum mit Sephadex G-200. (2,5 78 cm), Elutionspuffer: Citratsaline = 0,15 m NaCl 0,02 m Citrat mit HCl auf pH = 7,4; Durchflußgeschw. 8 ml/hr.

Die Art des Aktivators wurde im folgendem Versuch näher bestimmt: Mäuseserum wurde mittels einer Sephadex G-200 Säule aufgetrennt, die einzelnen Peaks vereinigt und der Einfluß auf die Peptidase-reaktion bei $c = \frac{1}{100}$ untersucht. Aus nachfolgender Tabelle wird ersichtlich, daß der Aktivator dem mittleren Peak zugehörig sein muß.

	Enzym + Substrat	Enzym + Substrat + Serum- fraktion
Peak I	0,385	0,400
Peak II	0,380	0,540
Peak III	0,385	0,420

4.7. Einwirkung auf natives Kollagen

Eine mögliche unspezifische Proteolyse der Peptidase wurde mit dem Caseintest nach Kunitz ausgeschlossen. Bei einer mehrstündigen Inkubation einer hochaktiven Enzympräparation konnte keine Differenz zwischen Probe und Blindwert festgestellt werden (Versuch 12).

Die Frage, ob das Pz-Penta-Peptid spaltende Enzym natives Kollagen abbauen kann, wurde mit der Methode der Viskosimetrie und Polarisimetrie beantwortet.

Die Viskosimetrie wurde wie bisher bei einer Temperatur von 20°C und einem Trispuffer (Tris-HCl, CaAc₂, NaCl) mit pH = 8,0 durchgeführt. In der nachstehenden Tabelle sind die zu den jeweiligen Zeitpunkten gemessenen Durchlaufzeiten zusammengestellt.

Zeitp. t=0 t=10' t=30' t=45' t=60' t=75' t=105' t=135' t=150'

Durch- 3'43" 3'44" 3'43" 3'44" 3'44" 3'43" 3'44" 3'42" 3'43"
laufz.

Dieser Versuch mit der gereinigten, hochaktiven Peptidase läßt eine Einwirkung auf natives Kollagen vollkommen ausschließen.

Die gleiche Enzymsubstratlösung, wie sie bei der Viskosimetrie verwendet wurde, wurde auch im Polarimeter mit thermostatisierter Kuvette (auf 20°C eingestellt) bei 405 mμ verfolgt. Untenstehende Tabelle bestätigt das viskosimetrische Resultat, daß die Peptidase natives Kollagen nicht angreift.

Ink.zeit	t = 0	t = 5'	t = 15'	t = 30'	t = 45'	t = 60'	t = 90'
----------	-------	--------	---------	---------	---------	---------	---------

Drehwert	177,64°	177,63°	177,63°	177,64°	unv.	unv.	unv.
----------	---------	---------	---------	---------	------	------	------

III. DISKUSSION

Bei den ersten Bemühungen, Kenntnisse über den enzymatischen Kollagenabbau zu bekommen, wurden Gewebeextrakte verschiedener Tiere und Kulturfiltrate von Bakterien untersucht. Die Ergebnisse waren recht dürftig und einzig die Befunde bei der Dasselfliege (64), Schmeißfliege (63) und bei den Kulturfiltraten von Clostridienarten (43, 44) hielten einer genaueren Nachprüfung stand.

Seitdem J. Gross und C. M. Lapiere 1962 die Methode der Gewebekultur in die Kollagenaseforschung einführten, konnten zahlreiche neue Kenntnisse auf diesem Gebiet gewonnen werden. In wenigen Jahren wurden Kollagenasen und kollagenspaltende Enzyme bei vielen Tieren und in verschiedensten Geweben aufgefunden und näher charakterisiert. Auf welches Phänomen ist dieser entscheidende Wandel zurückzuführen ?

Die beiden Forscher gingen von der Annahme aus, daß ein kollagenspaltendes Enzym im Extrakt nicht nachweisbar sein kann, weil es an das im Überschuß vorhandene natürliche Substrat gebunden ist. In ihrem klassischen Kulturversuch konnte das Enzym vom Gewebe in das umgebende Nährmedium diffundieren und so mit verschiedenen Methoden gemessen werden (Auflösung eines Kollagengels, Hydroxiprolinbestimmung, radioaktiver Kollagenasetest).

Erst vor kurzer Zeit wurde diese in ihren Ergebnissen recht fruchtbare Hypothese von einer sehr gut fundierten Inhibitortheorie abgelöst. A. Z. Eisen (132) stellte mit einem gegen die Kollagenase menschlicher Haut gerichteten Antikörper fest, daß sich mit einem kollagenaseinaktiven Medium des ersten Tages (= Extrakt) eine positive Immunreaktion ergab. Die Kollagenase mußte also durch ein Antikollagenaseprinzip in ihrer Aktivität blockiert sein. Durch Chromatographie von Hautextrakten an Sephadex G 150 konnte dieses Enzym von anderen Proteinen in seiner aktiven Form abgetrennt werden. Es konnte des weiteren festgestellt werden, daß bei diesem Reinigungsschritt das Enzym von den Antiproteasen des Serums, α_1 -Antitrypsin und α_2 -Makroglobulin abgetrennt wird. Neben der Abtrennung von Inhibitoren durch Gelchromatographie konnte die genannte Forschergruppe Antikörper gegen diese Inhibitoren herstellen, einem Hautextrakt zusetzen und zeigen, daß nunmehr nach

Ausfällung der Antiproteasenglobuline, die Kollagenase in enzymatisch aktiver Form vorlag.

Diese Befunde sprechen dafür, daß die bisher mit der Methode der Gewebekultur erzielten Ergebnisse keine in vitro Artefakte sind, sondern eine wichtige biologische Funktion widerspiegeln. Diese Enzyme werden kontinuierlich synthetisiert und sind für den physiologischen Kollagenabbau verantwortlich. Bei pathologischen Reizen wie Wunden (134) oder bestimmten Hauterkrankungen (135) kann ihre Aktivität beträchtlich stimuliert werden.

Es erhebt sich die Frage, wie die in jüngster Zeit berichteten Ergebnisse zu werten seien, wonach sowohl im physiologischen Bereich als auch bei bestimmten pathologischen Zuständen eine Kollagenaseaktivität im Extrakt bestimmter Gewebe nachweisbar sei. Entweder wird in diesen Fällen der Inhibitor durch biologische Schranken vor der Einwirkung auf die Kollagenase abgeschirmt oder das Enzym wird in solch hoher Menge produziert, daß seine Aktivität nicht mehr gänzlich unterdrückt werden kann.

In früheren Arbeiten über die menschliche Haut (133) wurde herausgefunden, daß der Gewebekultur zugesetztes Puromycin, ebenso wie Gefrieren und Auftauen eines Gewebestückchens vor Kultivierung, den Nachweis einer Kollagenaseaktivität unmöglich machte. Man schloß daraus, daß die Kollagenase in der Zelle nicht gespeichert wird. In Ergänzung mit den immunologischen Ergebnissen kann festgestellt werden, daß zwar das Enzym in aktiver Form gespeichert wird, aber in seiner Aktivität überwiegend durch Serumproteine reguliert wird.

Von hohem Interesse ist die Frage, von welchen Zellen der Haut die Kollagenase produziert wird. In der Gewebekultur der Haut liegen sowohl Zellen epithelialer Herkunft als auch Zellen mesenchymaler Herkunft (= Fibroblasten) vor. Die Zellen der Epidermis besorgen die Synthese der Hornsubstanz (Keratin) und haben zum Kollagen, welches erst im Corium vorkommt, keinerlei morphologische Beziehung. Dieser Aspekt führt dazu, daß man die Kollagenaseabscheidung ausschließlich von den ortsständigen Zellen des Bindegewebes (= Fibroblasten) erwartet. Weiterführend wäre noch die Frage, ob die Fibroblasten, die Kollagen synthetisieren, gleichzeitig in der Lage sind spezifisch wirksame Enzyme für dessen Abbau zu bilden, oder ob hier noch eine Differenzierung der Zellen erfolgt ist.

Grillo et al. (135) trennten von in Heilung begriffenen Wunden das Epithel vom darunterliegenden mesenchymalen Gewebe ab und testeten dieses Material getrennt auf kollagenolytische Aktivität. Sie konnten eine Kollagenolyse nur mit dem Epithel (!) erreichen, stellten aber gleichzeitig fest, daß bei Anwesenheit von mesenchymalen Gewebe der kollagenolytische Effekt erheblich verstärkt wurde. Diese bei der Wundheilung gemachten Beobachtungen lassen sich nicht unbedenklich auf die Verhältnisse der normalen Haut übertragen und sind nur sehr schwer zu interpretieren.

Sehr eingehend wurde die Frage untersucht, welche Zellorganellen Enzyme mit Kollagenspaltung abgeben oder speichern. Beim Vergleich der dabei erzielten Ergebnisse ist dabei ganz genau auf experimentelle Details zu achten. Frühe Untersuchungen stammen von Frankland und Wynn (136,137). Sie untersuchten subzelluläre Fraktionen von rat bone cells (Kern, schwere und leichte Mitochondrien, Mikrosomen und Supernatant) getrennt auf die Fähigkeit der Kollagenspaltung und fanden eine eindeutige Zuordnung der kollagenolytischen Aktivität bei pH = 4,0 zu der Lysosomenfraktion. Dieses für in vivo Verhältnisse sehr niedere pH-Optimum ist recht ungewöhnlich, doch weisen auch andere in Lysosomen vorkommende Enzyme ein ähnliches Maximum auf.

Die Gruppe von Aer und Kivirikko (138) untersuchten ebenso wie Woods und Nichols (137) die kollagenolytischen Enzyme von Rattenknochen. Zum Nachweis verwendeten sie die Änderung der Lichtdurchlässigkeit eines Kollagengels ("change of opacity"), die radioaktive Kollagenasebestimmung und zusätzlich das künstliche Kollagensubstrat Pz-Penta-Peptid. Die Aktivität des kollagenolytischen Enzyms ließ sich bei pH = 7,2 im 700 g Niederschlag (entspricht größeren Partikeln als Lysosomen) des Knochenzellhomogenates auffinden. Die Fragmente des radioaktiven Kollagens waren überwiegend höhermolekular, weniger als 10 % waren dialysabel.

Die Experimente mit dem künstlichen Kollagenasesubstrat führten zu der Vermutung, daß die Spaltung des künstlichen Substrates nicht mit der Spaltung nativen Kollagens einhergehen müsse. Eine Erforschung dieses Sachverhaltes wurde von den Autoren in der Diskussion empfohlen. (99)

Einen sehr wichtigen Beitrag zur Klärung dieser Frage leisteten

Heidrich et al.(139).Sie verwendeten das Pz-Penta-Peptid zum quantitativen Nachweis kollagenolytischer Enzyme und untersuchten damit die Fraktionen der Peroxysomen,Lysosomen und Mitochondrien von Rattenlebern.Dabei konnte die Fähigkeit der Peptidspaltung eindeutig den mitochondrialen Enzymen zugewiesen werden.In einem weiteren Versuch wurde die nämliche Fraktion mit nativem Kollagen zusammengegeben.Wie vermutet, konnte in diesem Fall keine Spaltung gefunden werden.

Aus den angeführten Arbeiten leitete sich eine sehr wichtige der zu klärenden Fragen ab,nämlich inwieweit künstliche Substrate,die bereits in einer großen Anzahl von Publikationen zum Nachweis von "Kollagenasen" verwendet wurden,dazu überhaupt geeignet seien.

(siehe S.18/19)

Eigene Experimente,die die Peptidase oder Kollagenase der Mäusehaut in bestimmten Zellpartikeln eindeutig lokalisieren,wurden nicht angestellt.Aus den Bestimmungen der lysosomalen Enzyme lassen sich jedoch bestimmte Rückschlüsse ziehen:Die Aktivität der Pz-Penta-Peptidase zeigt einen der sauren Phosphatase, β -Glucuronidase und β -D-Glucosaminidase sehr ähnlichen Verlauf.Von sehr hohen Anfangswerten fällt die Aktivität innerhalb der ersten fünf Tage sehr stark ab (Abb.19).Daß diese Effekte nicht auf autolytischen Prozessen beruhen,wurde durch die elektronenmikroskopische Untersuchung und den Züchtungsversuch (1.2.3.) eindeutig bewiesen.Den Schluß daraus zu ziehen,daß die Pz-Penta-Peptidase in den Lysosomen lokalisiert sein müsse,wäre verfrüht,da erstens die Aktivität anderer Partikel wie z.B. Mitochondrien nicht untersucht wurde und zweitens nur die Isolierung von Zellpartikeln mit anschließender Testung auf bestimmte enzymatische Aktivitäten beweisend sein könnte.Soweit bleibt also die Lokalisation der Peptidase offen, mit Sicherheit kann aber festgestellt werden,daß das kollagenolytische Enzym der Mäusehaut nicht den Lysosomen entstammt,da sich die Aktivitätsverteilungen (Abb.19,S.42) völlig verschieden verhalten.Somit ergibt sich aus dem Vergleich der lysosomalen Enzyme mit der Kollagenase und Peptidase ein erster sehr markanter Unterschied.

Mit der Methode der Hydroxyprolinbestimmung,des radioaktiven Kollagentests und der Viskosimetrie wurde ein einheitliches Maxi-

zum der Aktivität am 6.Tag (für rad. Kollagenasetest am 5.Tag; Erklärung hierzu S.32) gefunden.Daß dieser kollagenolytische Effekt nicht durch unspezifische Proteasen bedingt sein konnte,wurde durch den Caseintest nach Kunitz einerseits und Trypsinkontrollen andererseits offensichtlich.Eine eindeutige Analyse der enzymatisch entstandenen Kollagenfragmente konnte nicht vorgenommen werden.Die Abb.16 weist jedoch ebenso wie der auf S.45 (2.2.) beschriebene Versuch auf den höhermolekularen Charakter der Bruchstücke hin.

Bei der Anreicherung des kollagenolytischen Enzyms durch Gelfiltration an Bio-Gel A 1,5 (Versuch 14) wurde die Kollagen - und Peptidspaltung bei völlig verschiedenen Eluatmengen beobachtet. Die Peptidase wird mit einem Puffervolumen eluiert,mit dem Moleküle von etwa 150.000 Molekulargewicht aus der Säule austreten. Die Enzymaktivität weist ein einziges scharfes Maximum auf,in dessen Bereich auch kollagenolytische Effekte zu beobachten sind.Im Verlauf der später gelungenen Isolierung wurden diese Aktivitäten genau untersucht und weitere Aussagen über chemisch-physikalische Eigenschaften der Peptidase getroffen.

Die Spaltung radioaktiven Kollagens ergab eine dreigipflige Kurve (Abb.20).Peak 3 wurde als Folge der erhöhten Ionenstärke erklärt und beruht mit Sicherheit nicht auf der Tätigkeit eines Enzyms. In Peak 2 ist ein Enzym erfaßt,das radioaktives Kollagen spalten kann,das künstliche Peptid aber nicht angreift.Sein Molekulargewicht liegt um 20.000.Bei Peak 1 sind die Verhältnisse nicht so klar.Hier wäre zu entscheiden,ob ein weiteres kollagenolytisches Enzym vorliegt oder ob dieses Maximum als Nebeneffekt der an dieser Stelle hochaktiven Peptidase aufzufassen ist.

Zur genauen Klärung der Überlappung von Kollagen-und Peptidspaltung in Peak 1 können zwei Wege beschritten werden:Entweder man versucht,die beiden Aktivitäten durch weitere Maßnahmen voneinander abzutrennen,oder man trachtet danach,eines der beiden Enzyme in hochangereicherter oder sogar reiner Form in die Hand zu bekommen.Die Isolierung der Pz-Penta-Peptidase erschien aus verschiedenen Gründen für besonders ratsam:

a) Isolierungen von animalen Kollagenasen waren bereits vielfach durchgeführt worden;es wäre also nicht viel Neues aus diesem Ver-

such zu erwarten gewesen.

b) Die Isolierung der Peptidase erschien infolge des leichteren Nachweisverfahrens einfacher, erfolgversprechender und aussagekräftiger.

Mit relativ wenig Reinigungsschritten konnte ein sehr hoher Anreicherungsfaktor erzielt werden, wie aus der Tabelle S.51 hervorgeht. Die diskoelektrophoretische Analyse (Abb.23) der aktivsten Peptidasefraktion wies eine einzige Bande auf. Um dieses Enzym genauer zu charakterisieren, wurden einige seiner chemisch-physikalischen Eigenschaften bestimmt. Das Molekulargewicht beträgt 180000, die Michaelis-Menton-Konstante $2,7 \times 10^{-4}$, das pH-Optimum liegt bei 7,5. Durch Calciumionen wird es in seiner Stabilität beeinflusst, während die Aktivität durch Calciumentzug nicht verlorenggeht. Serumproteine einer bestimmten Fraktion (Peak 2, Abb.31) vermögen die Aktivität um 35 % zu steigern.

Mit der viskosimetrischen Methode konnte von Enzympräparationen, die das Peptid mit sehr hoher Geschwindigkeit spalten, keinerlei Effekt am nativem Kollagen nachgewiesen werden.

Die zum Schluß der Arbeit unternommenen Inhibitor-Aktivatorversuche erbrachten das interessante Ergebnis, daß im Gegensatz zu den meisten animalen Kollagenasen die Aktivität bei Serumgabe nicht abnimmt oder völlig zum Erliegen kommt, sondern in bemerkenswerter Weise ansteigt.

Diese Versuche haben eindeutig gezeigt, daß ein Enzym, welches das künstliche Peptid spaltet, nicht notwendigerweise auch natives Kollagen andauen muß. Die Tatsache, daß die Clostridiopeptidase A beide Substrate mit hoher Geschwindigkeit umsetzt, berechtigt noch nicht zu Analogieschlüssen bei höher organisierten Lebewesen. Daraus wäre die Forderung abzuleiten, daß jedes mit künstlichem Peptid erfaßte Enzym mit nativem Kollagen zu testen sei, bevor es als kollagenolytisches Enzym eingestuft werde.

Es wäre am Schluß noch darüber nachzudenken, welche Aufgabe die beiden untersuchten Enzyme der Mäusehaut in vivo zu erfüllen haben. Das kollagenolytische Enzym besitzt sicher die Funktion der physiologischen Kollagendestruktion. Die Peptidase soll nach Meinung verschiedener Autoren die durch Kollagenasen entstandenen Kollagenfragmente weiter abbauen:

Kollagen Kollagenase → Koll.frag. Peptidase → niedr.Pept.

Für diese sehr plausible Hypothese hat sich bislang keine experimentelle Stütze gefunden.

IV. Methodik

Versuch 1: Bestimmung von lysosomalen Enzymen (105,106)

1) Bestimmung der sauren Phosphatase (107,108):

- Reagentien : 1. Puffer-Substrat-Lösung (0,05 m Citratpuffer;
5,5 $\times 10^{-3}$ m p-Nitrophenylphosphat, pH = 4,8)
2. p-Nitrophenolstandartlösung (5 $\times 10^{-5}$ m)

Die Lösungen sind nur eine Woche bei 0°- 4°C haltbar, dann wird durch Hydrolyse der Blindwert erhöht.

Testansatz : 1,0 ml Puffer-Substrat-Lösung
0,2 ml Medium (3 u filtriert)

Blindwert : 1,0 ml Puffer-Substrat-Lösung

Genau 30 min. werden die Ansätze bei 37°C inkubiert. Abstoppen der Reaktion und Farbumschlag erfolgt durch Zugabe von 4,0 ml 0,1 n NaOH.

BP : + 4,0 ml 0,1 n NaOH
+ 0,2 ml Medium

Messung : bei 400 nm gegen BP

Einheit : 1 Phosphatase-Einheit ist die in einem Liter enthaltene Enzymlösung, die in 1 Stunde bei 37°C 1 mM p-Nitrophenol freisetzt.

Umrechnungsfaktor : E_{400} 2,76 = s. Phosph. Einheit

2) Bestimmung der β -Glukuronidase (109,110):

- Reagentien : 1. Phenolphthaleinglucuronid 0,01 m (pH = 5,0)
2. Acetatpuffer 0,1 m (pH = 4,5)
3. Trichloressigsäure 5 %
4. Alkalische Glycinlösung 0,4 m
5. Phenolphthalein-Standart (1 mg/ml)

Versuchsansatz: 0,1 ml Substrat-Lösung (1)
0,8 ml Puffer
0,1 ml abgekipptes Medium

Blindwert : wie Versuchsansatz, jedoch ohne Medium (wird erst beim Stoppen der Reaktion zugesetzt)

Ansätze werden kräftig geschüttelt.

Inkubation : 5 hr bei 37°C

Abstoppen der Reaktion : 2,5 ml Glycinlösung (4)
1,0 ml TCA (3)
1,5 ml Aq.dest.

Messung : gegen BP bei 540 nm.

Einheit : 1 Fishman-Einheit entspricht der Enzymmenge, die bei pH = 4,5 in 1 Stunde 1 μ Phenolphthalein aus einer 3×10^{-3} M Lösung Phenolphthaleinglucuronid freisetzt.

3) Bestimmung der N-Acetyl- -D-Glucosaminidase (111):

Reagentien : 1. 0,2 m Citronensäure-NaOH-Puffer, pH = 4,3
2. 0,01m p-Nitrophenyl-N-Acetyl- -D-Glucosaminid
3. 0,4 m Glycin-NaOH Puffer, pH = 10,5

Versuchsansatz : 0,75 ml Citratpuffer
1,0 ml von Reagenz 2
0,25 ml abgekipptes Medium
pH auf 4,4 einstellen!

Blindprobe : 0,75 ml Citratpuffer
1,0 ml von Reagenz 2
0,25 ml abgekippt. Medium erst bei Abstoppen der Reaktion zugeben.

Inkubation : 1 Stunde bei 38°C

Abstoppen der Reaktion mit 2 ml Glycinpuffer → Farbreaktion

Messung : bei 430 nm gegen BP

Enzymeinheit : wird in μ Mol freigesetzten p-Nitrophenol ausgedrückt.

Versuch 2 : Elektronenmikroskopie (112)

Zur elektronenmikroskopischen Untersuchung wurden Gewebestückchen der Mäusehaut verwendet, die 10 Tage lang kultiviert worden waren.

Die Hautstückchen wurden in 2-4 % iger Glutaraldehyd 2 Stunden lang fixiert und überschüssiger Glutaraldehyd mit DMEM-Medium 12 Stunden ausgewaschen. Sodann erfolgte eine 2-stündige Nachfixierung mit 1 % iger Osmiumsäure. In der aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Präparate entwässert. Über eine Zwischenstufe von Propylenoxid wurden sie für 12 Stunden in einer Mischung von Propylenoxid und Epon (1:1) inkubiert. Danach wurden die Proben in reines Epon überführt und 40 Stunden bei 60°C im Trockenschrank polymerisiert. Die Kapseln wurden erst nach 5-tägiger Lagerung geschnitten. Die Schnitte wurden mit einem Ultramikrotom der Firma LKB, Stockholm (Ultratome, Typ 4802 A) hergestellt.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden mit dem JEM-T-7 Elektronenmikroskop der Firma Jeol, Tokio hergestellt.

Versuch 3 : Sterilitätskontrolle der Gewebekultur mit Blutagar (Lit.: Müller J., Melchinger H. 1964)

2,0 gr Nähragar (Merck) und 0,7 gr NaCl werden in 100 ml aq. bi-dest unter Kochen gelöst.

Sterilisation der Lösung im Autoklaven 15 min. bei 121°C. Danach Abkühlung im Wasserbad auf etwa 50°C.

Zugabe von 5-10 ml steril entnommenen Blutes.

Das warme Gemisch wird unter sterilen Bedingungen auf keimfreie Petrischalen ausgegossen. Die Platten werden im Kühlraum bis zur Beimpfung mit etwas abgekippten Medium im Kühlraum bei 4°C aufbewahrt. Eine Platte wird im Brutschrank zur Infektionskontrolle inkubiert.

Versuch 4 : Proteinbestimmung des abgekippten Mediums nach Folin-Ciocalteus (Lit.: O. Folin und V. Ciocalteus 1927, M. Schaub 1967)

Reagenzien : 1 Teil Phenolreagenz nach Folin-Ciocalteus
(Merck) + 3 Teile H_2O
13,5 % wässrige Na-Carbonat (H_2O -frei)

Bestimmungsansatz : 1,0 ml abgekipptes Medium
1,0 ml Na-Carbonat 13,5 %
1,0 ml Phenolreagenz (1:4 verdünnt)

Blindprobe : An Stelle der Probe 1,0 ml Medium

Eichkurve : Aufstellung einer Verdünnungsreihe mit
standartisiertem BSA (Behring) und Bestimmung nach Folin

Messung : Nach 30 min. bei 780 nm gegen BP (Beckman -
Spektrophotometer)

Versuch 5 : Analytische Diskelektrophorese bei alkalischem pH
(Lit.: H.R.Maurer, 1968; M.Schaub und L.Strauch 1968,
Vorschrift der Firma WTW, Weilheim)
Apparatur : Analytische Diskelektrophoresekammer der
WTW Weilheim

Reagenzien : Elektrodenpuffer :

3 gr Tris + 14,4 gr Glycin mit 1 m NaOH
gepuffert auf pH = 9,0, mit aq. dest. auf
1 ltr. aufgefüllt.

Gelpuffer :

40,0 gr Tris mit 1m HCl auf pH = 8,0 gebracht
und mit aq. dest. auf 1 Liter aufgefüllt.

Stocklösungen : (entsprechen einem 7,5 % igem Gel, be-
zogen auf Acrylamid), Haltbarkeit bei 4°C
etwa 1 Woche

I. 30,0 gr Acrylamid und 0,8 gr N,N'-Methylenbisacryl-
amid (Bis), gelöst in 100 ml Gelpuffer

II. 1,6 ml Dimethylaminopropionitril gelöst in 100 ml
Gelpuffer

III. 0,04 gr Kaliumferricyanid gelöst in 100 ml Gel-
puffer

IV. 0,48 gr Ammoniumperoxidisulfat gelöst in 100 ml Gel-
puffer

Durchführung : Die Stocklösungen werden in Reihenfolge I,II,III,IV zu gleichen Teilen zusammengemischt, mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe in einem Gefäß etwa 20 min. entlüftet, in die Gelröhrchen eingefüllt und mit Gelpuffer überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu erreichen. Die Polymerisation geht bei Tageslicht und Zimmertemperatur vor sich und ist nach etwa 30 min. beendet. Die Gellänge beträgt 9 oder 10 cm. Nachdem der oberflächige Gelpuffer wieder entfernt ist, werden die Röhrchen in die Kammer eingesetzt. Das Auftragen der Proben erfolgt durch den inzwischen aufgefüllten Elektrodenpuffer hindurch, indem man mittels einer Spritze mit langer Kanüle unterschichtet. Es werden jeweils 100-500 µg Protein in etwa 5-10 µl aufgetragen. Um ein gutes Absetzen zu gewährleisten, wurde den Proben Saccharose zugesetzt.

Trennbedingungen : Stromstärke : $I = 4 \text{ mA}$ / Röhrchen
Laufrichtung: von oben (Kathode) nach unten (Anode)
Laufzeit : 3-4 Stunden

Anfärbungen : 1. Amidoschwarz:

1 gr Amidoschwarz 10 B in 100 ml 7 % iger Essigsäure gelöst und filtriert; 20 min. anfärben, in 1 % iger Essigsäure über Nacht entfärben.

2. Coomassie brilliant blue:

Anfärben mit 0,25 % iger Coomassie blue Lösung (in 20 % iger TCA) für 2-3 Stunden;

Entfärben : in 7,5 % iger Essigsäure

Versuch 6 : Hydroxiprolinbestimmung im abgekipptem Medium
(Lit.: H. Stegemann 1958)

Puffer : 50,0 gr Citronensäure $\times \text{H}_2\text{O}$
120 gr Na-Acetat 3 H_2O
34,0 gr NaOH
ad 1000 ml H_2O pH = 6,0

Gemisch : 10,0 ml H₂O

15,0 ml n-Propanol

25,0 ml Puffer

Chloramin T - Lösung : 0,420 gr / 50 ml Gemisch (täglich frisch zubereitet)

Perchlorsäure : 25,5 ml Perchlorsäure ad 100 ml H₂O

p-Dimethylaminobenzaldehyd : 5 gr / 100 ml n-Propanol
(täglich frisch zubereitet)

L-Hydroxiprolin-Standard-Lösung : 10 mg L-Hydroxiprolin (Merck) werden in 100 ml 0,001 n HCl gelöst = Stammlösung. Diese Stammlösung wird 1:10 bzw. 1:20 mit Wasser verdünnt, entsprechend 10 oder 5 ug Hypro /ml.

Vorbereitung der Probe: 2,5 ml des abgekippten Mediums werden mit 0,5 ml einer 90 % TCA gefällt. Dieses Gemisch wird bei 150000 UpM (Rotor SS 34, Sorvall) 30 min. zentrifugiert. Der Überstand enthält die niedermolekularen Hydroxiprolinfraktion und wird analysiert.

Durchführung :

0,5 ml des zu untersuchenden Supernatans werden 22 Std. nach Zugabe von 1,5 ml 8 n HCl bei 105°C hydrolisiert. Die Proben werden am Rotationsverdampfer eingedampft, in 1,0 ml H₂O wieder aufgelöst und erneut eingedampft. Zugabe von 4,0 ml H₂O sowie einer Spatelspitze Aktivkohle zur Adsorption der Farbstoffe und anschließende Filtration durch 0,45 µ Membran (Typ 11603, Sartorius-Membranfilter GmbH). 1,0 ml des Filtrates werden mit 1,0 ml Chloramin T-Lösung geschüttelt, 20 min. stehengelassen, mit 1,0 ml Perchlorsäure versetzt und 5 min. gewartet. Nach Zusatz von 1,0 ml p-Dimethylaminobenzaldehyd wird 18 min. im Wasserbad von 60°C inkubiert und nach Abkühlen der Proben die Extinktion bei 550 nm gegen eine Blindprobe, bei der nur H₂O in die Bestimmung eingesetzt wurde, gemessen (Beckman-Spektralphotometer). Den Hydroxiprolingehalt der unbekannten Lösung ermittelt man aus der bei der gleichen Bestimmung gewonnen Eichkurve 2,4,6,8,10 µg Hypro/ml.

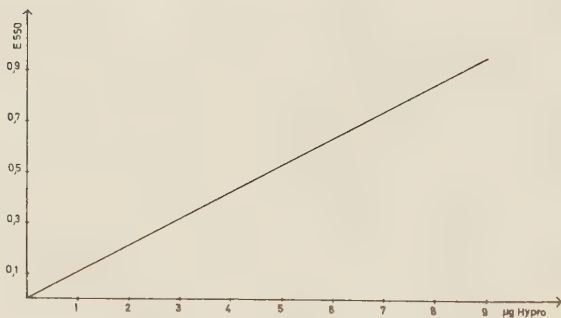


Abb.32 : Eichkurve für Hydroxiprolinbestimmung

Versuch 7 : Bestimmung der Kollagenase mit radioaktiv markiertem Kollagen

Vorbereitung der Probe : Das abgekippte Medium eines jeden Tages (1.-8. Tag) wurde mittels Druckdialyse 1 : 5 eingeengt (siehe Versuch 9).

Kollagenlösung : 4 mg ^{14}C - Kollagen / ml 0,1 % Essigsäure

Puffer : 0,2 m Tris-HCl, pH = 7,5
0,001 m Ca-Acetat

Ansatz : 0,25 ml Kollagenlösung
0,25 ml Puffer
gut schütteln und zur Gelierung mindestens 6 Stunden bei 37°C inkubieren

Nach Zugabe von 0,5 ml Enzymlösung Inkubation für 6 Stunden bei 37°C. Danach 30 min. bei 20.000 UpM und 30°C in vorgewärmter Zentrifuge (Sorvall, Rotor SS 34) zentrifugieren. Überstand dekantieren.

Bestimmungsansatz : 0,5 ml Überstand
4,0 ml abs. Äthanol
5,0 ml Bray'sche Lösung

Messung dieses Gemisches im Szintillationszähler (Tricarb-

Liquid-Scintillation-Counter, Packard).

Versuch 8 : Herstellung von radioaktiv markiertem Kollagen
(Lit.: Bornstein P. und K.A.Piez, 1966)

10 Meerschweinchen von etwa 200 gr Gewicht werden jeweils 100 μ C (Mikrocurie) 14 C- Glycin (Radiochemical Centre Amersham) intraperitoneal verabreicht. Nach Ablauf von 6 Stunden werden die Tiere getötet. Die Haut wird abgezogen, mehrfach in 2 Liter Wasser gewaschen und durch einen Fleischwolf gedreht. Danach wurde der Hautbrei gewogen und zweimal in kaltem Wasser gewaschen.

Gewinnung der neutralsalzlöslichen Kollagenfraktion (NLK): Die Haut wurde in der 10- 20-fachen Menge (bezogen auf das Gewicht) in kalter 1m NaCl, enthaltend 0,05 m Tris-HCl pH = 7,5 aufgenommen, für 24 - 48 Stunden in der Kälte aufbewahrt und dabei 8 - 10 mal kräftig umgeschüttelt. Nötigenfalls erfolgte eine pH - Korrektur mit 10 % iger NaOH.

Die Suspension wurde dann durch mehrere Lagen Verbandsmull filtriert, der Rückstand zur nächsten Extraktion aufbewahrt, das Filtrat durch Passieren eines Kieselgel-Kuchens in einem Buchner - Trichter gereinigt und entfettet. Durch Zugabe von kristallinem NaCl wurde die Kochsalzkonzentration im Filtrat langsam auf 20 % gebracht und das Kollagen damit ausgefällt.

Nach Zentrifugation bei 8000 rpm (Sorvall, GSA Rotor) für 30 min. konnten die vorgereinigten Präcipitate einer dreimaligen Waschung in 500 ml kalter 20 % NaCl zugeführt werden. Nach jeder Waschung erfolgte eine Zentrifugation wie oben angegeben.

Der Niederschlag der letzten Waschung wurde in aq. dest. unter Rühren gelöst, die ungelösten Bestandteile durch Zentrifugieren entfernt. Durch Ansäuern der Lösung mittels 0,5 m Essigsäure auf pH = 4,0 erfolgte eine letzte Umfällung mit anschließender Zentrifugation bei 8000 rpm (Sorvall, GSA Rotor). Das Präcipitat wurde in etwa 100 ml 0,5 m Essigsäure gelöst und ausgiebig gegen 1 % Essigsäure dialysiert. Nach Gefriertrocknung wurde das Material bei -20°C im Exsikkator über Phosphorpentoxid aufbewahrt. Die Neutralsalzextraktion wurde dreimal durchgeführt.

Gewinnung der säurelöslichen Kollagenfraktion (SLK):

Die Hautrückstände der Neutralsalzextraktion wurden ausgiebig in kaltem aq. dest. gewaschen und zweimal mit der 10-fachen Menge Natrium-Citrat-Puffer pH = 3,7 extrahiert.

Nach Filtration durch einen Kieselgel-Kuchen wurde die NaCl-Konzentration des Filtrates auf 5 % eingestellt, um das Kollagen auszufällen und durch 30 minütige Zentrifugation bei 8000 rpm (Sorvall, GSA Rotor) in den Niederschlag gebracht.

Dieses Präcipitat wurde in 1-2 Liter 1 M NaCl, enthaltend 0,05 M Tris-HCl pH = 7,5 gelöst, die NaCl-Konzentration auf 20 % erhöht, das Kollagen ausgefällt, wie oben abzentrifugiert, in aq. dest. wieder gelöst und gegen Wasser dialysiert. Nach Gefriertrocknung erfolgte die Aufbewahrung analog dem NLK.

NLK und SLK wurden im Gewichtsverhältnis 1 : 7 gemischt, in mit Essigsäure angesäuertem Wasser gelöst und erneut lyophilisiert. Dieses Material diente für die Enzymbestimmungen. Es hatte eine spezifische Aktivität von 1700 cpm / mg Kollagen.

Die Extraktionen wurden sämtlich in der Kälte durchgeführt.

Versuch 9 : Ultrafiltration mit dem Diaflow-Gerät:

Es handelt sich um die Amicon Ultrafiltration Cell Modell 52 der Amicon Corporation Lexington, Massachusetts. In dem Gerät lassen sich 100 ml ziemlich genau auf 5 ml einengen (üblicher Einengungsfaktor 1:5). Die Membran UM 20 E erlauben die Abtrennung von Molekülen mit einem Molekulargewicht unter 20.000. Ein zentriertes Rührwerk verhindert das Verkleben der Membranporen und ermöglicht einen schnelleren Arbeitsgang. Zur Kühlung während des Versuchs befindet sich das Gerät im Eisbad.

Versuch 10 : Viskosimetrie

(Lit.: Hoppe-Seyler/Thierfelder, Analyse 10. Auflage
von W. Kern und M. Mehren Band II.
J. Gross und Y. Nagai, 1965)

Reagenzien : Kollagenlösung: Säurelösliche Kollagenfraktion
0,4 % in 0,1 % Essigsäure

(Material : Kalbshaut)

Puffer : 0,2 m Tris-HCl, pH = 7,2

0,001 m CaAc₂

0,4 m NaCl

Ansatz : 1,0 ml Kollagenlösung + 2,0 ml Puffer
in der Kälte zusammengeben.

2,0 ml dieses Gemisches + 1,0 ml eingetragtes Medium (1:5 konz.) mischen.

Gerät : Viskosimeter Cannon 100 - Ubelohde mit
freihängendem Niveau. Wasserdurchlaufzeit 70 sec. Versuchstemperatur 20°C.

Messung: Zu verschiedenen Zeitpunkten wird die Durchlaufzeit t der im Viskosimeter inkubierten Enzym-Substrat-Lösung gemessen.

Auswertung der Meßergebnisse:

Berechnung der spezifischen Viskosität:

Nach der hydrodynamischen Theorie wird die Viskosität einer Lösung von der Störung bestimmt, die ein gelöstes Teilchen in der laminaren Strömung des Lösungsmittels verursacht. Im Falle des Fadenmoleküls Kollagen nimmt das Ausmaß dieser Störung und damit die Viskosität der Lösung ab, wenn das Molekül durch Spaltung verkürzt wird. Um hierfür eine charakteristische Größe zu gewinnen, dividiert man die Differenz aus der Viskosität der Lösung η und der des reinen Lösungsmittels η_L durch die Viskosität des reinen Lösungsmittels η_L .

Dann ergibt sich die spezifische Viskosität :

$$\eta_{sp} = \frac{\eta - \eta_L}{\eta_L} ;$$

Misst man bei so geringen Konzentrationen, daß die Dichteänderung der Lösung gegenüber dem Lösungsmittel vernachlässigbar klein ist, so kann vereinfachend für η die Durchlaufzeit t gesetzt werden und die Gleichung lautet somit

$$\eta_{sp} = \frac{t - t_L}{t_L} ;$$

t_L entspricht im vorliegenden Fall der Durchlaufzeit des Ansatzes, in dem an Stelle der Kollagenlösung aq. dest. eingesetzt wurde. t stellt den jeweiligen Meßwert dar.

Die spezifische Viskosität des Reaktionsgemisches zum Zeitpunkt $t = 0$ wurde gleich 100 % gesetzt und die im Verlauf der Inkubation beobachtete Viskositätsabnahme prozentual darauf bezogen.

Versuch 11 : Analytische Diskelektrophorese bei saurem pH
(Lit.: Reisfeld et al. 1962)

Elektrodenpuffer : 31,2 gr Alanin ad 1000 ml aq. dest; pH mit Eisessig auf 4,8

Stammlösungen : (für ein 7,5 % iges Gel, bezogen auf Acrylamid)

Lösung A : 24,0 ml 1 n NaOH
8,6 ml Eisessig
2,0 ml N,N,N,N'- Tetramethylaethylendiamin = TEMED

Lösung B : 24,0 ml 1 n KOH
1,93 ml Eisessig
0,23 ml TEMED

Lösung C : 15,0 gr Acrylamid
0,4 gr Methylenbisacrylamid

Lösung D : 5,0 gr Acrylamid
1,25 gr Methylenbisacrylamid

Lösung E : 2 mg Riboflavin

Lösung F : 70 mg Ammoniumperoxidisulfat

Die Reagenzien für die Lösungen A - F werden mit aq. dest auf jeweils 50 ml aufgefüllt. Die Lösungen A - E sind bei 4°C etwa 3 Wochen haltbar, die Lösung F nicht länger als etwa 5 Tage.

Durchführung :

Trenngel (= unteres Gel) : Die Lösungen werden in folgendem Verhältnis gemischt: A:C:H₂O:F = 1:2:1:4

Die Gellänge beträgt 8 oder 10 cm. Die in die Röhrchen eingefüllte Mischung wird mit Wasser so überschichtet, daß eine glatte, ebene Oberfläche entsteht. Das Gel wird unter der UV - Lampe etwa 45 min. polymerisiert.

Sammelgel (= oberes Gel) :

Die Lösungen werden im folgendem Verhältnis gemischt :

B:D:E:H₂O = 1:2:1:4;

Die Mischung wird auf das vom überschichteten Gelpuffer befreite Trenngel pipettiert, wieder mit Gelpuffer überschichtet und etwa 45 min. lang polymerisiert.

Trennbedingungen : Stromstärke I = 4 mA / Röhrchen

Laufrichtung : oben Anode, unten Kathode

Laufzeit : 4 - 5 Stunden

Färbung : wie bei analytischer Diskelektrophorese bei alkalischem pH.

Vorbereitung der Proben : die Reaktionsgemische der Viskosimetrie werden in ein Eisbad gebracht und mit NaCl auf 20 % (gew. %) aufgesättigt. Das ausgefällte Kollagen und seine Bruchstücke werden 15 min. bei 65.000 g (spino-Zentrifuge) abzentrifugiert und in 0,5 ml 8 m Harnstofflösung, die mit HCl auf pH = 5,3 eingestellt ist, gelöst. Nach Dialyse gegen diese Harnstofflösung in der Kälte werden jeweils etwa 0,05 ml auf das Gel aufgetragen.

Versuch 12 : Bestimmung unspezifischer proteolytischer Aktivität mit Casein

Reagenzien : Substratlösung : 1 gr Casein in 10 ml 0,1 n NaOH vorlösen, mit Puffer ad 100 ml auffüllen und pH auf 7,5 einstellen.

Pufferlösung : 0,05 m Tris-HCl-Puffer, 0,001 m CaAc₂; pH = 7,2

Bestimmungsansatz : 1,0 ml Substratlösung

1,0 ml abgek. Medium (entspricht Enzymlö.)

5 min. getrennt bei 37°C vorinkubieren, danach vereinigen und 30 min. inkubieren. Stop mit 3,0 ml 5 % Trichloressigsäure, Zentrifugation bei 8000 g. Messung der Extinktion im Überstand bei 280 nm gegen Blindprobe ohne Enzym.

Versuch 13 : Bestimmung der Peptidaseaktivität am synthetischen
Modell Pz-Penta-Peptid

Reagenzien : Pufferlösung : 0,05 m Tris-HCl-Puffer, 0,001 m
CaAc₂; pH = 7,5

Substratlösung : 162 mg Pz-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg
(Fluka) werden in wenigen Tropfen Methanol vor-
gelöst und mit der Pufferlösung auf 100 ml auf-
gefüllt (c = 2 µM/ml).

Standartlösung von Pz-Pro-Leu:

In einem 50 ml Meßkolben werden 20 mg Pz-Pro-
Leu eingewogen und mit Benzol auf 50 ml aufge-
füllt. Aus dieser Stocklösung wird eine Verdün-
nungsreihe angesetzt und die Extinktion bei
320 nm (Beckman-Spektrophotometer) gemessen.

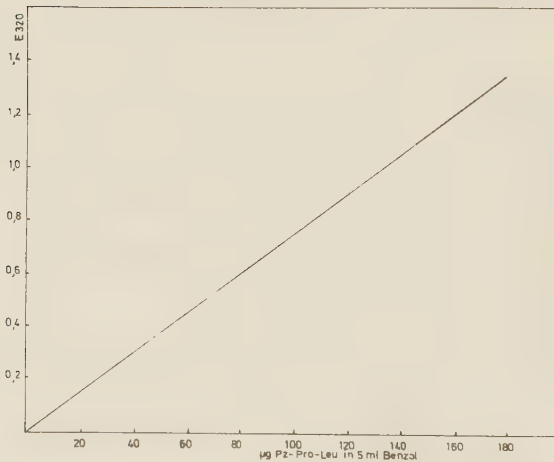


Abb.33 : Eichkurve für Peptidasebestimmung

Zitronensäure : 10 % (gr/v)

Ausführung der Bestimmung : 2,5 ml Substratlösung

0,5 ml abgekipptes Medium

Inkubation bei 37°C im Wasserbad; Stop mit 1 ml 10 % Zitro-
nensäure

Ausschütteln von Pz-Pro-Leu mit 5 ml Benzol

Zentrifugation bei etwa 1000 UpM zur Phasentrennung in
Tischzentrifuge;

Messung der Benzolphase gegen Benzol bei 320 nm.

Blindprobe : Enzymlösung wird unmittelbar nach Zugabe der
Zitronensäure zugegeben.

Versuch 14 : Säulenchromatographie mit Bio-Gel A 1,5 200-400 m
(Lit.: Informationsschrift der F. Bio-Rad;
H.Determann : Gelchromatographie, Springer
Verlag Berlin Heidelberg New York 1967)

Säulenmaße : 2,5×30 cm

Füllmaterial : Bio-Gel A 1,5 (200-400 mesh)

Elutionspuffer : 0,05 m Tris HCl, pH = 7,5
0,005 m CaAc₂

Durchflußgeschw.: 15 ml/hr (WTW-Pumpe)

Faktionen : 1 Fraktion zu 7,5 ml

Probe : 110 mg / 4 ml

In Trennpausen Spülung mit Natriumazidhaltigem Puffer
(0,02 %).

Leervolumen der Säule : Bestimmung mit Dextranblau 2000
(Merck) = 51 ml

Bestimmung des Salzvolumens siehe nachstehender Versuch

Versuch 15 : Bestimmung des Salzvolumens mit K(SCN)

Testsubstanz : 75 mg K(SCN) wurden in 4 ml Puffer gelöst
und zur Abtrennung geringer Verunreinigungen durch 0,2 µ
Membran (Sartorius-Membranfilter) filtriert.

Durchflußgeschw. : 15 ml/hr

Eluat : Fraktionen zu 5 ml

Bestimmung des K(SCN) -Gehaltes:

Reagenz : 1 % FeCl₃-Lösung (1 g FeCl₃ 1 ml 1 n HCl auf
100 ml H₂O)

Bestimmungsansatz : 1 ml Eluat

1 ml Reagenz

4 ml H₂O

Messung : Extinktion des $\text{Fe}(\text{SCN})$ -Komplexes bei 445 nm gegen Blindprobe (statt Eluat wird Gelpuffer verwendet)

Versuch 16 : Bestimmung der Proteinkonzentration der Fraktion durch Absorptionsmessung

Eichkurve : 100 mg Rinderserumalbumin werden in 100 ml Elutionspuffer aufgelöst und daraus eine Verdünnungsreihe hergestellt.

Messung : Extinktion bei 280 nm gegen Puffer.

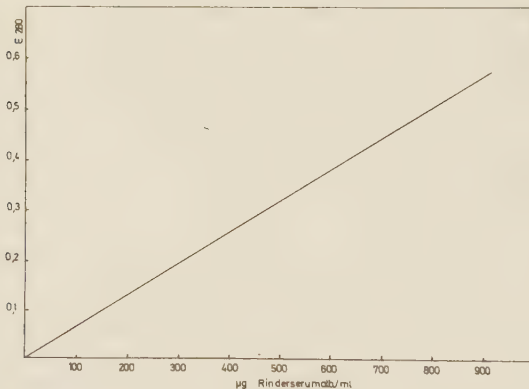


Abb. 34 : Eichkurve für Proteinmessung

Versuch 17 : Entsalzung mit Bio-Gel P 2

Säulenmaße : 2,5 30 cm

Füllmaterial : Bio-Gel P 2 (50-100 mesh)

Elutionspuffer : Es wird der Kammerpuffer der trägerfreien Elektrophorese (Versuch 18) verwendet.

Durchflußgeschwin. : 30 ml/hr

Eluat : Fraktionen zu 10 ml

Probe : 2080 mg / 50 ml

Messung : Registrierung des Durchflusses bei 280 nm mit UVI-CORD (LKB-Stockholm)

Versuch 18 : Trägerfreie kontinuierliche Elektrophorese

Apparatur : Elektrophoreseapparatur VaP III

Hersteller : Desaga GmbH, Heidelberg;

F. Bender u. Hobein GmbH, München

Trennmateriel : Entsalzte Medien (Versuch 17) vom 1.-3. Tag
nach Beginn der Kultivierung (im Eisbad gekühlt)

Elektrodenpuffer : 0,1 m Tris HCl; 0,01 m CaAc_2 ; pH = 8,0
k = 0,0055 s

Kammerpuffer : 0,0125 m Tris-HCl; 0,00125 m CaAc_2 ; pH = 8,0
k = 0,00080 s

Trennbedingungen : Spannung U = 1000 Volt

Stromstärke I = 100 mA

Temperatur t = 7°-8°C

Dosiergeschwindigkeit der Probe : 3,5 ml/hr

Absauggeschw. des Kammerpuffers : 185 ml/hr

Einspritzstelle : entspricht Fraktion 70

Fraktionen werden im Eisbad aufbewahrt.

Versuch 19 : Säulenchromatographie mit Bio-Gel A 0,5 (200-400 m)

Säulenmaße : 2,5 x 100 cm

Füllmaterial : Bio-Gel A 0,5

Elutionspuffer : 0,05 m Tris-HCl

0,005 m CaAc_2 ; pH = 8,0

Durchflußgeschwin.: 14 ml / hr

Durchflußrichtung: reverse flow

Fraktionen : zu 7 ml

Probe : Fraktionen mit starker Spaltung des künstlichen

Peptids der trägerfreien Elpho (Versuch 18)

Leervolumen der Säule : Prüfung mit Dextranblau 2000 (Merck)=
200 ml

In Trennpausen Spülung mit natriumazidhaltigem Puffer (0,02 %)

Versuch 20 : Dünnschichtchromatographie der PZ-Substratbruch-
stücke

(Lit.: Stahl E. 1962)

Es werden Kieselgel-G-Platten mit einer Schichtdicke von 0,25 mm verwendet.

Laufmittel : n-Butanol/Eisessig/Wasser/Pyridin = 45:9:36:30

Laufstrecke : 12 cm (v/v)

Probe : Pz-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg (Fluka)

Vergleichssubstanz : Pz-Pro-Leu (Fluka)

Rückstand aus mehreren eingedampften Peptidaseansätzen (Versuch 13).

Alle Proben werden in Methanol aufgelöst und aufgetragen.

Apparatur : Desaga-Kammer

Versuch 21 : Molekulargewichtsbestimmung durch Gelchromatographie (Lit.: Fritz H., Trautschold J., Werle E. 1965)

Versuchsbedingungen : siehe Versuch 19

Markersubstanzen : Katalase : Molekulargewicht = 230.000

Rindereserumalb. " = 67.000

Dextranblau 2000 zur Best. des Leervol.

Die Marker und das gereinigte Enzym werden in einem Laufchromatographiert. Die jeweiligen Elutionsvolumina werden durch Absorptionsmessungen der Fraktionen bei 280 nm und 405 nm (Soret-Bande der Katalase) bestimmt.

Die ermittelten Elutionsvolumina der Substanzen mit bekanntem Molekulargewicht ermöglichen die Aufstellung einer Eichgeraden, aus der durch Einsetzen des V_E/V_0 -Wertes der zu untersuchenden Substanz deren Molekulargewicht abgelesen werden kann. (Abb. 26)

Versuch 22 : Bestimmung des pH-Optimums der Peptidase

Pufferlösungen :

Stocklösung : 0,2 m Tris-HCl

0,2 m Na-Acetat

0,02 m Ca-Acetat

Herstellung der pH-Lösungen, indem je 100 ml Stocklösung mit 1 n HCl auf pH 5,0 bis 10,0 eingestellt wird.

Substratlösung : 162 mg Pz-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg werden in Methanol vorgelöst und mit physiol. NaCl auf

100 ml aufgefüllt.

Enzymlösung : gereinigte Enzymlösung im Säulenpuffer (0,05 m
Tris-HCl; 0,005 m CaAc₂; pH = 8,0)

Bestimmungsansatz: 0,2 ml Enzymlösung
2,8 ml Pufferlösung der jeweiligen pH-Stufe
0,5 ml Substratlösung

Inkubationszeit : 2 Stunden bei 37°C. Die Reaktion wird durch
1 ml 25 % ige Zitronensäure abgestoppt.

Weitere Durchführung siehe Versuch 13

Blindwerte : Zu jedem pH-Wert wurde ein Blindwert mitbestimmt,
indem statt 0,2 ml Enzymlösung 0,2 ml Säulenpuffer
in den Ansatz eingesetzt wurde.

Versuch 23 : Bestimmung der Michaelis-Menton-Konstante

Puffer : 0,05 m Tris-HCl

0,001 m Ca-Acetat, pH = 7,2

Substratstocklösungen : A : 81 mg Pz-Substrat/50 ml Puffer
entsprechend 2 μ M/ml

B : 81 mg Pz-Substrat /25 ml Puffer
entsprechend 4 μ M/ml

Enzymlösung : gereinigte Peptidase

Durchführung:

Aus den Substratstocklösungen wird mit Puffer eine
Verdünnungsreihe hergestellt, wobei für 0,1 - 2,0 μ M
Substrat/Ansatz Stocklösung A, für 2,4 - 4,0 μ M/An-
satz Stocklösung B verwendet wird. Endvolumen jeweils
2,0 ml.

Zugabe von 1,0 ml Enzymlösung

Inkubation 1 Stunde bei 37°C

Stop der Reaktion mit 1,0 ml 25 % iger Zitronensäure

Extraktion mit 5,0 ml Benzol .

Weitere Durchführung siehe Versuch 13

Die graphische Ermittlung der Michaelis-Menton-Konstante ist in
Abb. 28 dargestellt.

Versuch 24 : Abhängigkeit der Spaltung von Pz-Penta-Peptid von der Enzymkonzentration

Herstellung einer Verdünnungsreihe hochgereinigter Peptidase

Versuchsansatz : 1ml verd. Enzymlösung (mit Puffer 0,2 m
Tris-HCl; 0,001 m CaAc₂, pH = 7,2)
1 ml Puffer (wie für Verdünnung)
1 ml Pz-Penta-Lösung (im obigem Puffer)

Inkubation 1 Stunde

Weitere Durchführung siehe Versuch 13.

Versuch 25 : Auftrennung von Mäuseserum

Säulenmaße : 2,5 × 78 cm

Füllmaterial : Sephadex G - 200

Elutionspuffer : Citratsaline = 0,15 m NaCl + 0,02 m Citrat mit
HCl auf pH = 7,4;

Durchflußgeschw.: 8 ml/hr

Fraktion : 2 Fraktionen / hr

Durchflußrichtung : reverse flow

Probe : 1:1 verdünntes Mäuseserum (3 ml)

Probengewinnung : Erwachsene Mäuse anästhesiert und Blut
durch Herzpunktion entnommen. Nach Gerin-
nung wurde der Blutkuchen abzentrifugiert,
das hellgelbe Serum verdünnt und aufge-
trennt.

V. Zusammenfassung

1. Die Haut 3-5 Tage alter, weißer Mäuse konnte für eine Versuchsdauer von 10 Tagen mittels Suspensionstechnik sehr gut kultiviert werden. Die Vitalität der Zellen steht nach den enzymatischen und elektronenmikroskopischen Ergebnissen und einem Züchtungsversuch außer Zweifel.
2. Aktivitätsbestimmungen der Pz-Penta-Peptidase und der Kollagenase im täglich abgekippten Medium wurden durchgeführt. Die mit verschiedenen Methoden erzielten Ergebnisse stimmten sehr gut überein.
3. Durch Gelchromatographie konnte die Existenz einer echten Kollagenase gesichert werden. Einige ihrer Eigenschaften wurden bestimmt.
4. Für das Pz-Penta spaltende Enzym wurde ein Verfahren ausgearbeitet, das die Reindarstellung dieses Enzyms ermöglicht.
5. Die folgenden chemisch-physikalischen Eigenschaften des neu isolierten Enzyms wurden bestimmt: Charakterisierung der Spaltprodukte, Molekulargewichtsbestimmung, pH-Optimum, Michaelis-Menton-Konstante, Abhängigkeit von Calciumionen, Einwirkung von Serumproteinen, Angriff auf natives Kollagen.
6. In der Diskussion wurden einige aktuelle Probleme der Kollagenaseforschung angeschnitten und der Wert synthetischer Kollagenasesubstrate kritisch gewürdigt.

VI.Literaturverzeichnis

- 1) O.Bucher:Cytologie,Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen, Med. Verlag Hans Huber,Bern und Stuttgart (1967)
- 2) R.J.Boucek,N.L.Noble,K.Kao,H.R.Elsden:
J.Geront. 13, 2 (1958)
- 3) Sara Schiller, Studies on Hyaluronic Acid Synthetase in Structure and funktion of Connective and Skeletal tissue London Butterworths 1965
- 4) P.Karlson, Biochemie
Georg Thieme Verlag Stuttgart (1970)
- 5) D.J.Prockop,H.Holtzer,
BBA 83, 189 (1964)
- 6) D.S.Jackson, The Determination of Collagen and Elastin in Methods of Biochemical Analysis Volume XV.
Interscience Publishers, edited by David Glick
- 7) I.Mandl
Advance in Enzymology S 221 (1961)
- 8) H.Stegemann
Z.physiol. Chemie 311, 41 (1958)
- 9) J.F.Woessner
Arch.Biochem.Biophys. 93, 440 (1961)
- 10) W.Graßmann,K.Hannig,H.Endres,A.Riedel
Z. physiol. Chemie 306, 123 (1956)
- 11) W.Graßmann,K.Hannig,M.Schleyer
Z. physiol. Chemie 322, 71 (1960)
- 12) R.S.Baer
Adv. Protein Chem. 7, 69 (1952)
- 13) K.Kühn,W.Graßmann,U.Hofmann
Naturwissensch. 44, 538 (1957)
- 14) F.O. Schmitt
Proc.Amer.Philos.Soc. 100, 476 (1956)
- 15) J.Engel
Z. physiol. Chemie 334, 201 (1963)
- 16) J.Hurych,A.Nordwig
Das Leder 3, 60 (1965)

- 17) B.Peterkofsky and S.Udenfriend
J.Biolog.Chem. 238, 3966 (1963)
- 18) M.R.Stetten
J.Biolog. Chem. 181, 31 (1949)
- 19) F.M.Sinex, D.D. van Slyke and D.R.Christman
J.Biol.Chem. 234, 918 (1959)
- 20) B.Goldberg and H.Green
J.Mol.Biol. 21, 1-18 (1967)
- 21) G.Manner and B.S.Gould
BBA 72, 243 (1963)
- 22) G.Manner, B.S.Gould, A.Levi and A.Schantz
Vortrag 47th Ann.Meeting Fed. Am. Soc. Exper. Biol.
Atlantic City (USA) Abstr. 411 (1963)
- 23) A.Coronado, E.Mardones and J.E.Allende
Biochem. Biophys. Res. Comm. 13, 75 (1963)
- 24) D.S.Jackson, D.Watkins and A.Winkler
BBA 87, 152 (1964)
- 25) A.Coronado, E.Mardones, J.Celis and J.E.Allende
Vortrag VIth Internat. Congr. Biochem. New York Abstr. I-35
(1964)
- 26) S.Uderfriend
Science 152, 1335 (1966)
- 27) K.Juva and D.J.Prockop
BBA 91, 174 (1964)
- 28) B.N.Bachra and A.J. van der Erb
Biochem. 9, 3001 (1970)
- 29) O.Snellman
Acta Chem. Scand. 17, 1049 (1963)
- 30) R.H.Krtesinger, G.Manner, B.S.Gould and A.Rich
Nature 202, 438 (1964)
- 31) R.A.Malt and P.T.Speakman
Life Science 3, 81 (1964)
- 32) J.Vuust and K.A.Piez
J.Biolog.Chem. 245, 6201 (1970)
- 33) E.Lazarides and L.N.Lukens
Nature New Biology 232, 37 (1971)
- 34) K.A.Piez
Biochemistry 4 2590 (1965)

- 35) P.Doty and T.Nishihara "Recent Advances in Gelatin and Glue Research" (G.Stainsby,ed.) S. 92, London Pergamon Press
- 36) M.P.Drake,P.F.Davison,S.Bump,F.O.Schmitt (1958)
Biochemistry 5, 301 (1966)
- 37) K.Kühn
Leder 14, 287 (1963)
- 38) J.Gross "Connective Tissue,Thrombosis and Atherosclerosis"
S. 77 (I.H. Page,ed.) Acad.Press New York (1959)
- 39) K.Kühn,W.Graßmann,U.Hofmann
Naturwissensch. 47, 258 (1960)
- 40) J.H.Highberger,J.Gross and F.O.Schmitt
Proc.Natl.Acad.Sci. U.S. 37, 286 (1951)
- 41) K.Kühn,P.Fietzek,J.Kühn
Biochem. Z. 344, 418 (1966)
- 42) A.Nordwig,F.Jahn
Europ.J.Biochem. 3, 519 (1968)
- 43) F.P.Mall
John Hopkins Hosp. Rep. 1, 171 (1896)
- 44) E.Maschmann
Biochem. Z. 295, 1 (1937)
- 45) E.Hausmann u. E.Kaufmann
BBA 194, 612 (1969)
- 46) F.A.Waldvogel and M.N. Swartz
J.Bacteriol. 98, 662 (1969)
- 47) Y.Nagai and H.Noda
BBA 34, 298 (1959)
- 48) K.Heyns und G.Legler
Z. physiol. Chem. 315, 288 (1959)
- 49) W.Graßmann,H.Hörmann,A.Nordwig und E.Wünsch
Z. physiol. Chem. 316, 287 (1959)
- 50) W.Graßmann,K.Hannig,A.Nordwig
Z. physiol. Chem. 333, 154 (1963)
- 51) Nishigai
J.Biochemistry (Tokio) 48, 152 (1960)
- 52) A.Nordwig,H.Hörmann,K.Kühn,W.Graßmann
Z. physiol. Chem. 325, 242 (1961)
- 53) E.Wünsch, Z. physiol. Chem. 332, 295 (1963)

- 54) W.Graßmann u. A.Nordwig
Z. physiol. Chem. 316, 267 (1960)
- 55) E.Wünsch, Z. physiol. Chem. 332, 295 (1963)
- 56) E.Wünsch u. H.G.Heidrich
Z. physiol. Chem. 332, 300 (1963)
- 57) S.Seifter, P.M.Klein, Gallop, E.Meilman
J.Biol.Chem. 234, 285 (1959)
- 58) E.Yoshida and H.Noda
BBA 105, 562 (1965)
- 59) O.Kunina, G.A.Levdikova, V.O.Shpikiter
Aktualnye Vopr.Sovrem.Biokhim.Akad.Med.Nauk SSSR, Inst.Biol.
Med.Khim. 2, 92 (1962)
- 60) A.Nordwig u. L.Strauch
Z. physiol. Chem. 330, 153 (1963)
- 61) P.M.Gallop, O.O.Blumenfeld, S.Seifter
in Treatise on Collagen; Vol.1, Ramachandran, G.N., Ed.,
Academic Press, London, 1967 p.358
- 62) entspr. 60
- 63) R.P.Hobson
J.Biochem. 25, 1458 (1931)
- 64) D.F.Waterhouse u. H.Irzykiewicz
J.Ins.Physiol. 1, 18 (1957)
- 65) P.M.Gallop, S.Seifter and E.Meilman
J.Biolog.Chem. 227, 891 (1957)
- 66) J.Gross and C.M.Lapiere
Proc.Nat.Ac.Sci. 48, 1014 (1962)
- 67) Y.Nagai, C.M.Lapiere and J.Gross
Biochemistry 5, 3123 (1966)
- 68) J.Gross and Y.Nagai
Proc.Nat.Acad.Sci. 54, 1197 (1965)
- 69) T.Sakai and J.Gross
Biochemistry 6, 518 (1967)
- 70) D.G.Walker, C.M.Lapiere, J.Gross
Biochem. Biophys. Res.Comm. 15, 397 (1964)
- 71) H.M.Fullmer and G.S.Lazarus
Israel J.Med.Sci. 3, 758 (1967)
- 72) J.F.Woods and G.Nichols Jr., Science 142, 386 (1963)

- 73) J.Aer and K.J.Kivirikko
Z. physiol. Chem. 350, 87 (1969)
- 74) J.Gross in Chemistry and Molekular Biology of the Inter-cellular Matrix; Vol.3, Balazs E.A,ed.; Academic Press London 1970, p.1623
- 75) G.S.Lazarus, R.S.Brown, J.R.Daniels and H.M.Fullmer
Science 159, 1483 (1968)
- 76) A.Z.Eisen, J.J.Jeffrey and J.Gross
BBA 151, 637 (1968)
- 77) E.A.Bauer, A.Z.Eisen, J.J.Jeffrey
BBA 206, 152 (1970)
- 78) J.Gross, C.M.Lapiere and M.L.Tauzer in Cytodifferentiation and Makromolekular Synthesis; M.Locke, ed., Academic Press New York 1963, p.175
- 79) J.J.Jeffrey and J.Gross
Fed.Proc. 26, 670 (1967)
- 80) M.Itoi, M.C.Gnädinger, H.H.Slansky, H.J.Freeman, C.H.Dohlman
Exper. Eye Res. 8, 369 (1969)
- 81) S.J.Brown and C.A.Weller
Arch.Ophtal. 83, 74
- 82) S.J.Brown, C.A.Weller and H.E.Wassermann
Arch. Ophtal. 81, 370 (1969)
- 83) M.C.Gnädinger, M.Itoi, H.H.Slansky, C.H.Dohlman
Amer. J.Ophtal. 68, 478 (1969)
- 84) S.J.Brown, S.Akiya, C.A.Weller
Arch.Ophtal. 82, 108 (1969)
- 85) H.H.Slansky, M.C.Gnädinger, M.Itoi, C.H.Dohlman
Arch.Ophtal. 82, 108 (1969)
- 86) A.Bennick and A.M.Hunt
Arch.Oral Biolog. 12, 1 (1967)
- 87) J.M.Evanson, J.J.Jeffrey and S.M.Krane
Clin.Res. 15, 293 (1967)
Science 158, 499 (1967)
- 88) E.D.Harris Jr., G.L.Cohen, S.M.Krane
Arthritis Rheumat. 11, 486 (1968)
- 89) G.S.Lazarus, J.L.Decker, C.M.Oliver, J.R.Daniels, C.V.Multz
and H.M.Fullmer, New Engl.J.Med. 279, 114 (1968)

- 90) J.M.Evanson in Chemistry and Molekular Biology of Inter-cellular Matrix, Vol.3, E.A.Balazs,ed.; Academic Press London 1970, p.1637
- 91) E.D.Harris,D.R.DiBona,S.M.Krane
J.Clin.Invest. 48, 2104 (1969)
- 92) L.L.Espey and P.J.Rondell
J.Appl.Physiol. 23, 757 (1967)
- 93) L.Strauch in Chemistry and Molekular Biology of Inter-cellular Matrix, Vol.3, E.A.Balazs,ed.; Academic Press, London 1970, p.1675
- 94) D.Platt
Z.Ges.Exper.Med. 150, 185 (1969)
- 95) D.Platt
Klin.Wochenschr. 48, 1420 (1970)
- 96) E.Laakonen,I.W.Sherbon and G.H.Wellington
J.Food Science 35, 181 (1970)
- 97) G.Gries,H.Buresch and L.Strauch
Experientia 26, 31 (1970)
- 98) K.K.Mäkinen
Acta Odont.Scand. 28, 485 (1970)
- 99) E.Harper and J.Gross
BBA 198, 286 (1970)
- 100) H.G.Heidrich,D.Prokopova,K.Hannig
Z. physiol. Chem. 350, 1430 (1969)
- 101) J.Aer
Scan.J.Clin.Invest. 25, 36 (1970)
- 102) F.N.Hu,C.S.Livingood,P.Johnson,C.M.Pomerat
J.Invest.Dermat. 20, 357 (1953)
- 103) O.Bucher
Schweiz.med.Wochensch. 76, 290 (1946)
- 104) H.Keilova
Experientia 4, 483 (1948)
- 105) A.L.Tappel in J.T.Dingle,H.B.Fell: Lysosomes in Biology and Pathology 1969 North-Holland Publishing Company Amsterdam,London
- 106) H.U.Bergmeyer
Methoden der enzym. Analyse 1970 Verlag Chemie Weinheim

- 107) A.B.Novikoff in The Cell 2 423 (1961) Academic Press
New York
- 108) A.J.Szczypinski
Am.J.clin.Pathol. 17, 571 (1947)
- 109) C.de Duve,B.C.Pressman,R.Gianetto,R.Wattiaux,F.Appelmanns
Biochem.J. 60, 604 (1955)
- 110) W.H.Fishman,S.S.Goldman,R.DeIellis
Nature 213, 457 (1967)
- 111) J.Findlay,G.A.Levy and C.A.Marsh
Biochem.J. 69, 467 (1958)
- 112) L.Reimer, Elektronenmikroskopische Untersuchungs-und Prä-
parationsmethoden, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York
- 113) H.Stegemann (1967) 2.Aufl.
Z. physiol. Chem. 311, 41 (1958)
- 114) Y.Nagai,C.M.Lapierre and J.Gross
Biochemistry 5, 3123 (1966)
- 115) K.Kühn,P.Iwangoff,F.Hammerstein,H.Stecher,M.Durruti,H.Holz-
mann und G.W.Korting
Z. physiol. Chem. 337, 249 (1964)
- 116) J.H.Fessler
Biochem.J. 76, 452 (1960)
Biochem.J. 76, 463 (1960)
- 117) J.Gross and Y.Nagai
Proc.Nat.Acad.Sci. 54, 1197 (1965)
- 118) H.R.Maurer, Diskelektrophorese, Walter de Gruyter u. Co
- 119) W.Thorun Berlin 1968
Z.klin.Chemie u. klin.Biochem. 9, 3 (1971)
- 120) J.M.Evanson,J.J.Jeffrey,S.M.Krane
J.Clin.Invest. 47, 2639 (1968)
- 121) M.Kunitz
J.gen.Physiol. 30,291 (1947)
- 122) siehe 56
- 123) A.N.Schwartz and B.A.Zabin
Analyt.Biochem. Vol.14 No.3 (1966)
- 124) K.Hannig
Z. physiol. Chem. 338, 211 (1964)
- 125) K.Hannig, Jahrbuch der Max-Planck-Gesellschaft S.117 (1968)

- 126) H.Determann, Gelchromatographie, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York (1967)
- 128) H.R.Mahler and E.H.Cordes, Biological Chemistry
A Harper International Edition (1969)
- 129) G.Penso u. D.Balducci, Tissue Cultures in Biological Research, Elsevier Publ. Company, Amsterdam (1963)
- 130) R.C.Parker, Methods of Tissue Culture, Harper and Row Publ. 3.Ed., New York (1961)
- 131) Eagle, Oyana, Levy, Freeman
J.Biol.Chem. 226, 196 (1957)
- 132) A.Z.Eisen, E.A.Bauer, J.J.Jeffrey
Proc.Nat.Ac.Sci. 68, 248 (1971)
- 133) A.Z.Eisen and J.Gross
J.Develop.Biol. 12, 408 (1965)
- 134) A.Z.Eisen
J.Invest.Dermatol. 52, 442 (1969)
J.Invest.Dermatol. 52, 449 (1969)
- 135) H.C.Grillo, J.Gross
J.Cell Biol. 23, 39 (1964)
- 136) D.M.Frankland and C.H.Wynn
J.Biochem. 84, 20 (1962)
- 137) J.F.Woods and C.H.Nichols
Nature 208, 1325 (1965)
- 138) J.Aer u. K.J.Kivirikko
Z. physiol. Chem. 350, 87 (1969)
- 139) H.G.Heidrich, D.Prokopova, K.Hannig
Z. physiol. Chem. 350, 1430 (1969)
- 140) M.C.Schaub and L.Strauch, Biophys, Biochem. Res. Comm. 21, 34 (1965)
- 141) W.M.Mitchell
BBA 159, 554 (1968)

Lebenslauf

Am 4. Juni 1947 wurde ich in Passau als Sohn des Studienrates Andreas Brandmair und seiner Frau Katharina (geb. Hofmann) geboren.

1953 kam ich in die Volksschule Freising. Nach vier Jahren trat ich an das humanistische Domgymnasium über. Im Jahre 1966 legte ich das Abitur mit so großem Erfolg ab, daß ich das sog. Hundhammerstipendium bekam. Zum WS 1966/67 schrieb ich mich an der Julius Maximilians-Universität Würzburg für das Fach Medizin ein, legte im Herbst 1967 das Vorphysikum und im Frühjahr 1969 das Physikum ab.

Vom SS 1969 ab studierte ich an der Universität München und bestand im Herbst 1972 das Staatsexamen mit der Note sehr gut.

